

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA

PROGRAMA DE ENSEÑANZA

AREA DE POSTGRADO

**ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA A NIVEL MOLECULAR Y
CUANTITATIVO DE SEIS PROCEDENCIAS DE CAOBA (*Swietenia macrophylla*
King.) DEL AREA DE CENTROAMÉRICA Y MÉXICO**

Tesis sometida a la consideración del Comité Técnico Académico del Programa de Estudios de Postgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, para optar al grado de

MAGISTER SCIENTIAE

por

SIMÓN ABDÓN VÁSQUEZ WILSON

CATIE

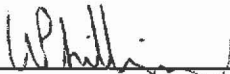
Turrialba, Costa Rica

1998

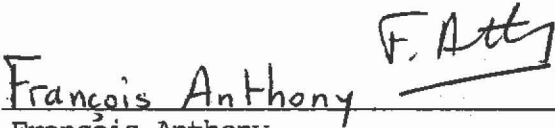
Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma, por la Dirección de la Escuela de Postgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del CATIE y aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar al grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

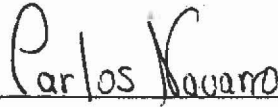
FIRMANTES:



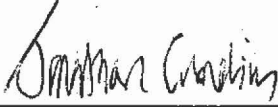
Wilbert Phillips
Profesor Consejero



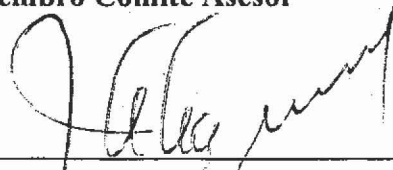
François Anthony
Miembro Comité Asesor



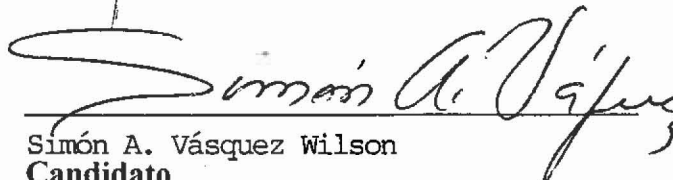
Carlos Navarro
Miembro Comité Asesor



Jonathan Cornelius
Miembro Comité Asesor



Juan A. Aguirre
Director y Decano de la Escuela de Postgrado



Simón A. Vásquez Wilson
Candidato

DEDICATORIA

A la memoria de mi padre Simón A. Vásquez M. (q.d.e.p).

A mi esposa e hijos por el amor, la paciencia y el aliento que siempre me dieron.

De manera especial a mi hijo Franklin Simón que con la candidez de su edad fue un motivo constante de inspiración.

A mis hermanos y tías.

A la Familia Guardia-Levy, por ser tan especiales.

A mi patria "PANAMÁ" de la cual me siento muy orgulloso de ser uno de sus hijos.

AGRADECIMIENTO

A Dios Todopoderoso

Al Banco Interamericano de Desarrollo (BID) y a la Universidad de Panamá por el financiamiento de mis estudios mediante el Programa UNIPAN-BID III.

Al proyecto *"Assessment of genetic diversity of economically and ecologically important tropical tree species of Central America and the Caribbean: implications for conservation, sustainable utilization and management. European Commission, Contract no TS3-CT94-0316"* por permitirme la utilización del material de su colección de semillas de caoba.

Al Ing. Rodrigo Cambra M.Sc. Decano de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Panamá, por su confianza y permanente ayuda durante mi estadía en el CATIE.

A mi consejero, Wilbert Phillips Mora M.Sc. Por su amistad, consejos, dedicación y el permanente interés de transmitir sus conocimientos. "Muchas gracias Wilbert."

A Jonathan Cornelius M.Sc. Por la constante y valiosa orientación ofrecida en el desarrollo de la investigación, especialmente en la interpretación de los resultados.

A Don Carlos Navarro P. M.Sc. Por su ayuda en la selección del germoplasma y en el diseño de los ensayos cuantitativo y molecular.

Al Dr. Francois Anthony. Por sus sugerencias y opiniones sobre el estudio molecular.

A Francisco Mesén Ph.D. Por la amabilidad que siempre tuvo al solventar mis dudas.

A los biometristas, Licenciado Johnny Pérez, y Christoph Kleinn Ph.D.. Por las ayudas y sugerencias en el análisis de los resultados.

Al personal del Laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Biotecnología del CATIE.

A Franklin Omar Guardia L., mi cuñado y representante legal en la República de Panamá, por toda la ayuda brindada.

Finalmente a mis compañeros de estudio, en especial a mis colegas de la Maestría en Biotecnología.

VÁSQUEZ, S.A. 1998. Estudio de la variabilidad genética a nivel molecular y cuantitativo de seis procedencias de caoba (*Swietenia macrophylla* King.) del área de Centroamérica y México.

Palabras claves: *Swietenia macrophylla*, variabilidad genética, RAPDs, ADN, índice de diversidad genética, fragmentación heredabilidad.

RESUMEN

La caoba (*S. macrophylla*) es una de las maderas más apreciadas del mundo. Es originaria de América tropical incluyendo Centro América, en donde debido a su sobreexplotación, durante los últimos 30 años, varias de sus poblaciones naturales se han ido perdiendo substancialmente, lo que tiene serias consecuencias pues afecta la constitución genética de la especie.

La determinación de la variabilidad genética es importante ya que permite el entendimiento de la estructura genética de una especie para lograr su apropiada caracterización., debido a esto se consideró la importancia realizar este estudio.

La presente investigación se realizó en el CATIE, Turrialba, Costa Rica, entre noviembre de 1997 y agosto de 1998. Se estudió la variabilidad genética a nivel molecular y cuantitativo de 42 familias de caoba provenientes de seis procedencias del área de Centroamérica y México. Se compararon los resultados con un estudio previo de los progenitores de estas familias para estimar el efecto de la fragmentación forestal sobre las progenies.

Para el ensayo molecular se aisló el ADN de hojas jóvenes. Los polimorfismos generados a través de la metodología RAPDs, se registraron en tablas que sirvieron de base para la estimación de la variabilidad genética. Se detectó mediante el análisis de varianza molecular la existencia de mayor diversidad genética dentro de las procedencias que entre ellas. Se corroboró mediante los índices de diversidad de Nei y Shannon esta distribución de la variabilidad. El índice de diferenciación genética (G_{st}) obtenido de 0,43, indica que el 43 % de la diversidad total se encuentra distribuída entre las procedencias.

Las procedencias estudiadas se asociaron en dos grupos básicos, uno conformado por las familias de Panamá y el otro por el resto de las procedencias de Centroamérica y México, lo que sugiere que ambos grupos tiene un origen y/o evolución diferente.

La comparación de los resultados de esta investigación con los obtenidos en el estudio de los padres de las familias evaluadas, refleja que en el caso de las procedencias de Costa Rica y Panamá, el efecto de la fragmentación forestal está influyendo en la diversidad genética de las mismas.

El estudio cuantitativo demostró la existencia de una alta variabilidad genética dentro y entre procedencias. Se evaluaron seis variables cuantitativas, de las cuales solamente manifestaron índices bajos de heredabilidad las variables largo de raíz y la relación materia seca aérea / materia seca de raíz.

No fue posible hacer inferencias en aspectos evolutivos entre las familias estudiadas sobre la base de los grupos formados mediante los promedios de las variables cuantitativas. Tampoco se pudo relacionar los grupos de ambos ensayos debido a la poca cantidad de variables cuantitativas que se obtienen en la etapa de vivero.

VÁSQUEZ, S.A. 1998. Study of the genetic variability at a molecular and quantitative level of six mahogany (*Swietenia macrophylla* King.) provenances of the area of Central America and Mexico.

Key words: *Swietenia macrophylla*, genetic variability, RAPDs, DNA, genetic diversity index, fragmentation, heredibility.

SUMMARY

Mahogany (*S. macrophylla*) is one of the most valuable wood in the world. It was originated in Tropical America including Central America, whereby due to its overexploitation during the last 30 years, many of their natural population have been lost subsequently, which in turn has serious consequences since it affects the genetic constitution of the specie.

The determination of the genetic variability is important since it allows the understanding of the genetic structure of the specie, in order to achieve their appropriate characterization. Due to this fact, it was considered important to realize this study.

The present investigation was carried out in CATIE, Turrialba, Costa Rica from November 1998 until August 1998. The genetic variability at a molecular and quantitative level of 42 families of Mahogany of six provenance of Central America and Mexico was studied. The results were compared with a previous study of the progenitors so as to estimate the effect of the forest fragmentation over the progeny.

For the molecular trial, DNA of the young leaves was isolated. The polymorphisms generated through the RAPDs analysis were registered on tables, which then served as a basis for the estimation of the genetic variability. It was detected with the molecular analysis of variance, the existence of the greatest genetic diversity within the provenances than between them. This variability distribution was corroborated with the indices of Nei and Shannon's. The obtained genetic variability index (G_{st}) of 0.43, suggests that 43% of the total diversity are distributed between provenances.

The provenances studied were associated in two basic groups: one, which was conformed by the family of Panama and the other for the rest of the provenances of Central America and Mexico, this suggests that both groups have different origin or evolution.

The results of this investigation in comparison with those obtained in the study evaluating the progenitors family, suggests that in the case of the provenance of Costa Rica and Panama the effect of the fragmentation of the forest is influencing their genetic diversity.

The quantitative study demonstrated the existence of a high genetic variability within and between the provenances. Six quantitative variables were evaluated, in which they only manifested low indices of heredability in the variables of root length and in the relation of aerial dry matter/root dry matter.

It was not possible to realize inferences about evolutive aspects between the families studied on the basis of the groups formed with the quantitative variables means. Also it was not possible to relate the groups of both trials due to the few number of quantitative variables that were achieved at the nursery stage.

CONTENIDO

RESÚMEN	v
SUMMARY	vi
LISTA DE CUADROS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivo general.....	3
1.1.1. Objetivos específicos.....	3
1.2. Hipótesis.....	4
2. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1. Generalidades de <i>Swietenia macrophylla</i> . King.....	5
2.1.1 Ubicación taxonómica.....	5
2.1.2. Descripción de la especie.....	5
2.1.3. Biología floral.....	5
2.1.4. Distribución natural.....	6
2.2. Importancia de la conservación de los recursos genéticos forestales.....	7
2.3. Variabilidad genética forestal.....	8
2.3.1. Causas de la variabilidad genética forestal.....	9
2.4. Cuantificación de la diversidad genética forestal.....	11
2.4.1. Ensayos de procedencias.....	11
2.4.2. Estadísticas genéticas.....	11
2.4.3 Comparación de los métodos usados para estimar la variabilidad genética.....	12

2.4.4. Utilización de marcadores moleculares.....	13
2.5. Evaluación de la diversidad de <i>Swietenia spp.</i> y otras Meliáceas.....	14
2.6. Descripción de la metodología RAPDs.....	15
2.7. Estimación de los índices de similitud y distancias genéticas.....	16
2.8 Conglomerados.....	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
3.1. Metodología.....	18
3.2. Ensayo molecular.....	18
3.2.1. Material vegetal.....	19
3.2.2. Aislamiento del ADN.....	19
3.2.3 Determinación de la cantidad y concentración del ADN.....	22
3.2.4. Selección de <i>primers</i> y amplificación de los fragmentos de ADN.....	23
3.2.5. Lectura y registro de los productos de la amplificación.....	24
3.2.6. Análisis de los datos moleculares.....	24
3.3. Ensayo cuantitativo.....	29
3.3.1 Preparación del material.....	29
3.3.2. Diseño experimental.....	29
3.3.3 Análisis de los datos cuantitativos.....	31
3.3.3.1. Registro de los datos.....	31
3.3.3.2. Prueba de normalidad.....	31
3.3.3.3. Análisis de varianzas.....	31
3.3.3.4. Heredabilidad.....	32
3.3.3.5. Comparación múltiple de medias.....	33

4. RESULTADOS	35
4.1. Ensayo molecular.....	35
4.1.1. Resultados del aislamiento del ADN.....	35
4.1.2. Análisis de los fragmentos RAPDs.....	36
4.1.3. Prueba de Chi ²	36
4.1.4. Índices de diversidad.....	37
4.1.5. Análisis de varianza molecular.....	41
4.1.6. Análisis discriminante canónico.....	42
4.1.7. Dendograma.....	43
4.1.8. Análisis bootstrap.....	46
4.2. Ensayo cuantitativo.....	46
4.2.1. Resultados de las pruebas estadísticas.....	46
4.2.2. Prueba de normalidad.....	46
4.2.3. Análisis de varianzas.....	46
4.2.4. Comparaciones de medias.....	47
4.2.5. Heredabilidad.....	51
5. DISCUSIÓN	53
5.1. Estimación de la variabilidad genética molecular.....	53
5.1.1. Comparación entre los resultados de la variabilidad genética molecular y lo informado en un estudio previo llevado a cabo con los padres de los materiales sujetos a estudio.....	57
5.2. Comparación de la variabilidad genética en el ámbito cuantitativo y molecular.....	60
6. CONCLUSIONES	64
7. RECOMENDACIONES	67

8. BIBLIOGRAFÍA.....	68
9. APÉNDICES.....	73
1. Protocolo de extracción CTAB-Minipreparaciones.....	73
2. Estimación de la concentración de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa.....	75
3. Lista de los <i>primers</i> evaluados en el ensayo de variabilidad genética de procedencias de caoba.....	77
4. Muestra del formulario de registro de los polimorfismos encontrados en el ensayo de variabilidad genética de procedencias de caoba.....	78
5. Resultados del análisis discriminante canónico del ensayo de variabilidad genética de procedencias de caoba.....	79
6. Salida del análisis Bootstrap mediante el programa MEGA del estudio de variabilidad genética de procedencias de caoba.....	82
7. Resultados del análisis de varianza y las pruebas de Tukey para las diferentes variables del ensayo cuantitativo.....	83
8. Costos de procesamientos de muestras de RAPDs (Método CTAB-Minipreparaciones.....)	89
9. Dendograma que ilustra el resultado de las agrupaciones de <i>S. macrophylla</i> en el estudio de los padres realizado por Wilson <i>et al</i> , 1997.....	92

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Actividades de Laboratorio y campo realizadas para estudiar la diversidad genética de caobas, de seis procedencias del área de Centroamérica y México.....	18
Cuadro 2. Ubicación regional de las familias de caoba (<i>S. macrophylla</i>) utilizadas en el estudio de variabilidad genética.....	20
Cuadro 3. Secuencia de nucleótidos de los <i>primers</i> polimórficos utilizados en el estudio de variabilidad genética de procedencias de caoba.....	24
Cuadro 4. Procedencias y familias evaluadas en el ensayo cuantitativo de diversidad genética de caoba.....	29
Cuadro 5. Rendimiento de la extracción de ADN para las familias de <i>S. macrophylla</i> sujetas a estudio, mediante el método CTAB modificado. CATIE, 1998.....	35
Cuadro 6. Secuencias de los diez <i>primers</i> utilizados, con el número de bandas amplificadas y el número de bandas polimórficas.....	36
Cuadro 7. Probabilidad (0,05), de las frecuencias de las bandas polimórficas existentes en la investigación de variabilidad genética de caoba. Prueba de X^2	37
Cuadro 8. Componentes de la diversidad genética entre y dentro de las procedencias evaluadas mediante el índice de diversidad de Shannon.....	38
Cuadro 9. Diversidad total (Ht), dentro de procedencias (Hs) y coeficiente de diferenciación genética (Gst). Según Nei (1973).....	40
Cuadro 10. Niveles de diversidad genética según Shannon y Nei para las diferentes procedencias de caoba sujetas a estudio.....	41
Cuadro 11. Distribución de los componentes de la varianza molecular.....	42
Cuadro 12. Heredabilidades y coeficientes de variación genética aditiva de las familias d caoba evaluadas a nivel de vivero a los 106 días de edad. CATIE 1998.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Areas donde han sido seleccionados árboles de caoba y se ha colectado material de herbario, semillas y hojas para estudios del ADN.....	21
Figura 2. Flujo de las etapas seguidas en el análisis del ensayo molecular de variabilidad genética de caobas provenientes de Centroamérica y México.....	26
Figura 3. Flujo de las etapas seguidas en el análisis del ensayo cuantitativo de variabilidad genética de caobas provenientes Centroamérica y México.....	34
Figura 4. Distribución espacial de las familias en función de las variables canónicas CAN 1 y CAN 2.....	44
Figura 5. Dendograma basado en el método UPGMA para 41 familias de caoba (<i>S. macrophylla</i>) de seis procedencias del área de Centroamérica y México.....	45
Figura 6. Alturas (cm) de las procedencias a los 106 días.....	48
Figura 7. Largos de raíz (cm) de las procedencias a los 106 días.....	48
Figura 8. Diámetro del cuello del tallo (cm) de las procedencias a los 106 días.....	49
Figura 9. Rendimiento de materia seca de la parte aérea (g) de las procedencias a los 106 días.....	49
Figura 10. Rendimiento de materia seca de la raíz(g) de las procedencias a los 106 días.....	50
Figura 11. Rendimiento de materia seca de la parte aérea/rendimiento de materia seca de la raíz de las procedencias a los 106 días.....	50
Figura 12. Distribución natural de <i>S. macrophylla</i> en el área mesoamericana de acuerdo con Lamb (1966) y la situación actual según Navarro 1997.....	58

1. INTRODUCCIÓN

Aunque el 46 % de los bosques tropicales del planeta se encuentran en América Latina, sólo en la región de Centroamérica y el Caribe los mismos se están perdiendo a un ritmo de 0,7 % por año, siendo la relación entre la reforestación y la deforestación de 1:27 (Winograd, 1995). Las altas tasas de deforestación constituyen una amenaza real para especies endémicas como lo es *Swietenia macrophylla*, motivo por el cual se hacen grandes esfuerzos por que la misma sea incluida en el apéndice II de CITES (Convención para el comercio internacional de especies de flora y fauna en peligro de extinción) a petición de los gobiernos de Estados Unidos y Costa Rica (Patiño, 1997).

Dentro de la familia de las Meliáceas un gran número de especies tienen potencial como productoras de madera y sólo a algunas de ellas se les utiliza en forma amplia. Los dos géneros más aprovechados en los neotrópicos son *Cedrela* y *Swietenia*, a los cuales se les conoce en el área de América Central como cedros y caobas respectivamente.

Desde el siglo pasado hasta la actualidad, estos géneros han sido el pilar del desarrollo de la industria forestal latinoamericana por ser autóctonos de la región y por ser maderas muy apreciadas internacionalmente. Cubren el territorio neotropical desde México hasta Brasil y Argentina, pasando por Centro América y algunas islas del Caribe. Sus individuos adultos se presentan en baja proporción en las poblaciones naturales (de 0,125 a 0,25 árboles por hectárea) y poseen una baja regeneración natural (Patiño, 1997).

Si no hubiera una variabilidad genética adecuada en las características de interés económico, cualquier intento por utilizar la genética para mejorar los árboles forestales sería infructuoso o fracasaría. En consecuencia, lo primero que se debe hacer al iniciar un programa de mejoramiento genético forestal es determinar la cantidad, causa y naturaleza de la variación presente en la especie de interés y aprender como utilizarla (Zobel y Talbert, 1992).

Aunque algunas especies como *S. macrophylla* y *C. odorata* son las latifoliadas tropicales más importantes en los neotrópicos, se ha estudiado muy poco su diversidad genética, lo cual es fundamental para definir el estatus de conservación *ex situ* e *in situ* de estas especies y para el desarrollo de programas de plantaciones y de mejoramiento genético así como para la resolución de numerosos problemas en el campo de la biología de poblaciones (Bawa y O'Malley, 1987 y Patiño, 1997).

Durante las últimas décadas las poblaciones de estas dos especies han sido severamente afectadas y disminuídas por diversos factores, resaltando los procesos de deforestación que disminuyen las poblaciones y el aprovechamiento selectivo sobre los mejores individuos, lo cual puede afectar la constitución genética de las poblaciones (Patiño, 1997).

Recientemente ha aumentado el interés en el estudio y conservación de la variabilidad genética de las caobas como resultado del alto grado de deforestación detectado en las áreas en donde estas especies son nativas (Newton *et al.*, 1997). Así por ejemplo, a partir de colectas extensivas de poblaciones de *S. macrophylla*, en seis países del área de Centro América, se ha concluído, que importantes poblaciones naturales de esta especie se han estado perdiendo sustancialmente durante los últimos 30 años (Wilson *et al.*, 1997).

Actualmente, el uso de marcadores moleculares como RAPDs (Random Amplified Polimorphic DNA) y otros, han cobrado importancia como herramientas mas eficientes para el estudio de la variabilidad genética de poblaciones forestales a nivel molecular, obviando las variaciones debidas a otras causas (como el medio ambiente) y permitiendo conocer con mayor precisión, el contenido de la molécula de la herencia, el ADN. Así se confirmó en los trabajos realizados con marcadores RAPDs, en ensayos de procedencias, para estimar la variabilidad genética de ocho especies de Meliaceae provenientes de cuatro géneros (Chalmers *et al.*; 1994).

En el área de Mesoamérica, el CATIE en colaboración con el ITE (Institute of Terrestrial Ecology) de Escocia estudió la variabilidad genética de *S. macrophylla* para lo cual se analizó usando RAPDs, el ADN obtenido de hojas colectadas *in situ*. En dichas colectas también se obtuvo semillas que son la base del presente estudio, pues se consideró que era importante determinar si la fragmentación forestal ha tenido algún tipo de efecto sobre las siguientes generaciones de los árboles de caoba en el recién fragmentado bosque húmedo centroamericano (Wilson, *et al*, 1997).

1.1. Objetivo general

Analizar la variabilidad genética existente a nivel molecular y cuantitativo de cuarenta y dos familias de polinización abierta de caoba provenientes de seis procedencias del área de Centroamérica y México.

1.1.1 Objetivos específicos

- Determinar usando RAPDs, la variabilidad genética de cuarenta y una familias de caoba provenientes de seis procedencias de Centroamérica y México.

- Determinar la variabilidad genética de las mismas familias utilizando variables de genética cuantitativa en el estudio de las plántulas.

- Comparar la variabilidad genética encontrada en el análisis cuantitativo, con la encontrada en el estudio molecular.

- Comparar la variabilidad molecular, con los resultados de investigaciones anteriores.

- Establecer a partir de los resultados, los primeros pasos para el diseño de estrategias de conservación genética de caoba para las procedencias estudiadas.

1.2 Hipótesis

Existen diferencias genéticas atribuibles a su origen entre las caobas (*S. macrophylla*) del este de Panamá Costa Rica (Zona Central Norte), Nicaragua (Bonanza), Guatemala (Petén), México (Quintana-Roo) y Costa Rica (Pacífico Seco).

Hay relación entre la variabilidad genética molecular y lo encontrado mediante variables cuantitativas en el estudio de plántulas.

Hay relación entre la variabilidad genética molecular de las descendencias y lo informado en un estudio llevado a cabo con los padres de esos materiales.

Con base en las interrogantes mencionadas se establecen las siguientes hipótesis nulas:

- Ho1: No existen diferencias de variabilidad genética entre las procedencias del este de Panamá, Costa Rica (Zona Central Norte), Nicaragua (Bonanza), Guatemala (Petén), México (Quintana-Roo) y Costa Rica (Pacífico Seco) en sus parámetros genéticos con base en el análisis molecular.
- Ho2: No existen diferencias en la variabilidad genética entre las procedencias del este de Panamá, Costa Rica (Zona Central Norte), Nicaragua (Bonanza), Guatemala (Petén), México (Quintana-Roo) y Costa Rica (Pacífico Seco), en sus parámetros genéticos con base en el análisis cuantitativo.
- Ho3: No existe relación entre los parámetros genéticos moleculares y cuantitativos.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Generalidades de *Swietenia macrophylla* King

2.1.1. Ubicación taxonómica.

El género *Swietenia* se ubica dentro de la familia Meliaceae, subfamilia Swietenioideae (Lamb, 1966). Presenta tres especies: *S. mahagoni* Jacq., *S. humilis* Zucc. y *S. macrophylla* King. (Pennington, 1981). Todas son conocidas como caobas pero en adelante, (salvo que se indique lo contrario), el texto se referirá con este nombre exclusivamente a *S. macrophylla*, por ser el objeto del presente estudio.

2.1.2. Descripción de la especie

La caoba (*S. macrophylla*) es un árbol que puede alcanzar unos 50 metros de altura, de tronco recto y con diámetros promedios de 75 a 150 cm, se encuentra libre de ramas en sus primeros 18 a 20 metros, desde donde desarrolla una copa espesa en la mayoría de los casos. (Gueilfus, 1994, Stanley, 1946). Las hojas son alternas, compuestas, paripinadas con 3 folíolos de 12 a 40 cm de largo (Lamb, 1966).

Los racimos florales son de 10 - 15 cm o más de largo, salen de la base de las hojas y tiene muchas flores monoicas, pequeñas y de pedúnculo corto. (Little, 1967)

El fruto es una cápsula ovoide, leñosa y dehiscente de 11 a 18 cm de largo. La caoba tiene un promedio de 60 semillas por fruto y 12 por lóculo. Son de color café rojizo, planas y de alas largas. (Alvarenga *et al*, 1988; Stanley, 1946).

2.1.3. Biología floral

Styles (1972), analizó la biología de las flores de las Meliáceas y su papel en el mejoramiento de los árboles, señala que la mayoría de los botánicos las describen como hermafroditas y perfectas, esto debido a que cada flor parece tener ambos órganos reproductivos, pero a pesar de que estén presentes tanto la antera como el pistilo en cualquier flor, no son efectivos los dos sexos. En la flor masculina funcional, las anteras son

largas de color amarillo y llenas de polen, el cual se libera por dehiscencia longitudinal durante la antesis. En tales flores, sin embargo, a pesar de que el ovario y el pistilo presenten una apariencia normal en tamaño y forma, los óvulos que contienen son minúsculos y rudimentarios, los mismos no llenan completamente el lóculo del ovario como lo hacen las flores femeninas funcionales. Ese ovario estéril es conocido como pistiloide y es incapaz de desarrollarse más, además el estilo es más largo que en la flor femenina funcional.

S. macrophylla es una especie monoica, con flores de ambos sexos en la misma inflorescencia, las masculinas son más abundantes que las femeninas con panículas axilares hasta de 15 cm. de largo y glabras. Las flores masculinas son actinomorfas, de 6 a 8 mm. de diámetro; cáliz verde amarillento muy pequeño con 5 lóbulos redondeados; pétalos verde amarillentos, de 4 a 5 mm. de largo, oblongos u oblongo ovalados con el ápice redondeado; estambres de color crema, de 10 a 4 mm. de largo. Los filamentos están unidos en un tubo estaminal. Las anteras están incluidas en el cuello del tubo nectario. El ovario es rudimentario con 5 lóculos, cada lóculo con numerosos óvulos muy pequeños, el estilo es grueso llegando hasta el ápice del tubo estaminal, terminando en un gran estigma peltado. Las flores femeninas son muy parecidas a las masculinas, pero con las anteras muy pequeñas, indehiscentes y sin polen, con un ovario muy grande y ovoide que llena el tubo estaminal, presenta óvulos bien desarrollados; toda la flor excepto el nectario es glabra (Pennington y Sarukhán, 1968).

Los únicos insectos asociados en la polinización de las flores de *Swietenia* han sido los trips (*Thysanoptera*), incluyendo a *Frankliniella bispinosa*, *F. insularis*, *Pseudotrrips inequalis*, *Frankliniella Spp.* (Howard et al, 1995).

2.1.4. Distribución natural

Las tres especies reconocidas del género *Swietenia* presentan distribuciones geográficas bien definidas. La distribución de *S. humilis* se limita a la costa del Pacífico de México y América Central. Por otro lado, *S. mahagoni* se restringe al área comprendida

entre el sur de Florida, las islas Bahamas y las antillas mayores, con excepción de Puerto Rico (Lamb, 1966).

De acuerdo con Lamb (1966) y Patiño (1997), la distribución de *S. macrophylla* se extiende desde los 23 °N. a través de América Central, hasta los 18° S. en América del Sur (desde México hasta Brasil). En México se encuentra desde el Sur de Tamaulipas, siguiendo el litoral atlántico, hasta la península de Yucatán; con presencia en Centro América, desde Belice hasta el Norte de Costa Rica (excluyendo a El Salvador). La especie presenta una discontinuidad en su distribución natural a partir de la zona central norte de Costa Rica hasta la costa del Pacífico de Panamá, desde donde continúa a través del noroeste de Sudamérica, Paraguay, hasta Bolivia y Brasil.

2.2. Importancia de la conservación de los recursos genéticos forestales

Un aporte fundamental de los bosques naturales, y especialmente de los bosques tropicales, es su gran diversidad, pues este rango de variación provee la base para la selección y el mejoramiento genético actual y futuro. La gran incertidumbre sobre las demandas futuras, hace que cobre tanta importancia la conservación de los recursos genéticos actuales. Además del número relativamente pequeño de especies de árboles de importancia económica o de importancia doméstica para algunas comunidades locales, cada uno de ellos debe ser el objetivo principal de programas de conservación, pues en los bosques naturales pueden estar conviviendo varios cientos ó aun miles de otras especies de las cuales se conoce muy poco o nada de su valor (Kemp, 1993).

Es de importancia fundamental asegurar una base genética amplia y diversa, sin embargo, debido a la creciente presión sobre los bosques naturales, las fuentes primarias de material genético están en muchos casos en peligro de desaparecer o quedar reducidas a poblaciones de escaso valor genético, lo que puede provocar la pérdida de sus alelos por deriva genética, incremento en la homocigosidad y enmascaramiento de genes recesivos deleténeos (Storfer, 1996). Por lo tanto, se requieren acciones urgentes para proteger y conservar la variación genética existente, con el fin de satisfacer entre otros propósitos, las

necesidades futuras de semilla para la plantación de árboles (Keiding y Gradual 1989). Es por tanto urgente dar una base planificada y científica a las acciones de conservación y considerarlas como un proceso dinámico de los planes y estrategias de aprovechamiento de estos recursos. Lo anterior, es especialmente válido para las poblaciones de *Swietenia* y *Cedrela* en los neotrópicos (Patiño, 1997).

2.3. Variabilidad genética forestal

La variabilidad genética es la expresión de las diferencias genotípicas entre individuos de una población (lo que implica que los individuos tienen genotipos diferentes). En general, entre mayor sea la variación de la constitución genética entre los individuos (variación genética más amplia) mayores posibilidades tienen las especies o poblaciones para reproducirse, sobrevivir o adaptarse a diferentes condiciones ambientales. (Heiding, 1991).

Uno de los objetivos de estudiar la variación genética, es comprender la distribución presente de la variación producida por la combinación de las fuerzas naturales y las actividades humanas (Namkoong 1986).

Las poblaciones naturales contienen una gran cantidad de variabilidad tanto para caracteres cuantitativos como cualitativos (Nei, 1973). Los caracteres cuantitativos son generalmente afectados tanto por factores genéticos como por ambientales. Por otro lado, la variación en los caracteres cualitativos por lo general, no está influenciada por el medio ambiente (Marini *et al*, 1993).

La extensión de la variabilidad genética en poblaciones naturales ha sido ampliamente estudiada con relación a los caracteres cuantitativos utilizando principalmente métodos morfométricos (El-Kassaby y Sziklai 1982). Esos estudios no dan mucha información significativa de la variación simple por locus debido a que tienden a ser poligénicos y las relaciones entre los componentes genéticos y fenotípicos de esos caracteres son algo complicadas (Nei, 1973).

El estudio de la diversidad genética y las relaciones existentes entre y dentro de las diferentes especies, poblaciones e individuos, es el objetivo central para varias de las disciplinas de las ciencias biológicas (Weising, *et al*, 1995).

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 mejoramiento genético de los recursos, o bien, para la conservación de los mismos; desdichadamente esta información es muy limitada o no existe para la mayoría de las especies tropicales (Patiño, 1997).

Dentro del contexto del mejoramiento genético forestal, un aspecto fundamental es la conservación, la cual comprende la provisión y protección de una base de variación genética, en la que se puede aplicar selección para obtener material mejorado. La “provisión” involucra la búsqueda e identificación de recursos genéticos a través de la exploración (en poblaciones naturales) y el estudio de sistemas de cruzamiento y de la estructura genética de las especies individuales. Generalmente, este último aspecto implica el estudio de la variación entre y dentro de poblaciones en ensayos de procedencias y progenies (Keiding, 1991).

2.3.1. Causas de la variabilidad genética forestal

Básicamente, todas las diferencias entre árboles son el resultado de tres factores: los diferentes ambientes en los cuales los árboles crecen, las diferencias genéticas entre los árboles y las interacciones existentes entre los genotipos de los árboles y los ambientes en los cuales éstos crecen. En los árboles forestales existen varias categorías de variación que pueden agruparse ampliamente en especies, orígenes geográficos (procedencias), rodales, sitios, árboles individuales y la variabilidad dentro de los árboles individuales (Zobel y Talbert, 1992).

De acuerdo con Zobel y Talbert (1992), el tipo de sistema de apareamiento dentro de una especie tiene un efecto importante sobre el patrón de variación. Los sistemas de

polinización abierta que son comunes en la mayoría de las especies de árboles forestales, producen, en general, poblaciones genéticas muy variables (heterocigóticas). En estos sistemas, diferentes genotipos se cruzan eficazmente entre sí, y ocurren pocas cruces exitosas entre las estructuras masculinas y femeninas de la misma planta o con individuos estrechamente emparentados.

En poblaciones existentes a lo largo de rangos amplios de elevación, latitud, y otras variables ambientales continuas, el gradiente ambiental puede resultar en la formación de un gradiente en las frecuencias alélicas, produciendo un cambio gradual en las características a lo largo del rango. En este caso, hay un traslape continuo de poblaciones, pero dos rodales ubicados en los extremos del rango claramente constituyen o conforman poblaciones distintas con diferencias alélicas consecuentes con la selección natural. Este tipo de variación se conoce como variación genética clinal. También la selección natural puede causar variación ecotípica. Un ecotipo es una población de una especie, que muestra adaptación a su ambiente. Los dos tipos de variación no son excluyentes (Cornelius, 1995).

De acuerdo a Zobel y Talbert (1992), *clina* se define como “un gradiente de una característica medible, el cual obedece a un gradiente ambiental”. La *clina*, por definición, está basada en una sola característica que muestra variación continua; puede o no estar fijada genéticamente. Dentro de una población dada puede haber toda una serie de *clinas* para diferentes características. El reconocimiento de las *clinas* en el mejoramiento forestal es muy importante, y fenómenos como la resistencia a la sequía o al frío por lo general siguen un patrón clinal. Dado que las *clinas* se refieren a una característica dada y no a la constitución genética completa de una población, el concepto de *ecotipo* (adaptación de genotipos completos o de complejos génicos a ambientes específicos) sería más útil para el genetista forestal. Sin embargo, dado que los ecotipos y las *clinas* ocurren en la naturaleza, el genetista forestal necesita conocer ambos en forma adecuada.

Se ha demostrado a través tanto de ensayos de campo clonales como de progenies, que existen variaciones entre árboles dentro de poblaciones de especies forestales (Cornelius

1995). Dependiendo de la característica, el coeficiente de la variación genética aditiva típicamente varía entre un 5 y 45 % (Cornelius, 1995). Por su parte, Leakey y Newton (1994), señalan que las diferencias entre los valores genotípicos de diferentes clones pueden alcanzar un 900 %.

De acuerdo con Boshier y Lamb (1997), la deforestación y la fragmentación, a través de la división de grandes poblaciones en pequeños vecindarios aislados, puede no sólo reducir el tamaño de la población, sino también, acelerar la tasa de endogamia al reducir el flujo de genes entre poblaciones vecinas. En poblaciones fragmentadas pequeñas, el aislamiento genético de los vecindarios podría, con el tiempo, conducir a un aumento de la endogamia y causar erosión de la variación genética.

2.4. Cuantificación de la diversidad genética forestal

2.4.1. Ensayos de procedencias

El método tradicional para determinar la variabilidad genética forestal ha sido mediante ensayos de procedencias y progenies. En este tipo de ensayos se plantan árboles de varias procedencias y progenies en un solo lugar. Pueden darse grandes diferencias de comportamiento entre las procedencias para las características de interés económico (Mesén 1995). Los ensayos de procedencias son una herramienta esencial para estimar el grado de variación que existe dentro de una especie. Para especies de distribución amplia, la selección de procedencias puede seguir las siguientes etapas o fases: a) Muestreo de procedencias de rango amplio, b) Muestreo de procedencias de rango restringido y c) fase de validación de procedencias. Al iniciar la primera etapa, frecuentemente se conoce muy poco sobre los patrones de variación de la especie. Por tal motivo, la decisión sobre cuáles procedencias incluir se hace con base en los factores ambientales y geográficos de la distribución natural de la especie (Pedersen *et al*, 1993).

2.4.2. Estadísticas genéticas

También se pueden utilizar las estadísticas sobre la diversidad genética (Nei 1973), para estimar sus niveles dentro y entre poblaciones. Estas estadísticas distribuyen la

diversidad genética total (H_T) de las especies en componentes que representan la diversidad dentro de la población (H_S) y entre poblaciones (D_{ST}), de forma análoga a la que el análisis de varianza distribuye la varianza dentro y entre grupos. Los componentes de la diversidad de genes son aditivos:

$$H_T = H_S + D_{ST}$$

El componente H_S representa la porción de la variación compartida entre poblaciones, mientras D_{ST} es una medida de la diferenciación entre las poblaciones de la especie. El coeficiente de diferenciación genética, G_{ST} , se calcula dividiendo D_{ST}/H_T o la razón de la diversidad entre poblaciones a la diversidad genética total. Un valor de G_{ST} cerca de 1 indica que la mayor parte de la diversidad genética ocurre entre las poblaciones, mientras que un G_{ST} cerca de 0, sugiere que las poblaciones individuales no están bien diferenciadas y que la diversidad genética de las especies es compartida entre sus subdivisiones (Loveless y Hamrick 1987).

Por otro lado, se pueden determinar los componentes de la diversidad dentro y entre poblaciones mediante el índice de diversidad de Shannon (Russell *et al*, 1993). Los componentes de la diversidad se calculan mediante la fórmula: $H_o = - \sum P_i * \log_2 P_i$ donde P_i = es la frecuencia fenotípica. Los componentes de diversidad entre las procedencias se calculan mediante la fórmula: $(H_{sp} - H_{pop}) / H_{sp}$, en donde H_{sp} representa el total de la diversidad detectada en todas las procedencias, y H_{pop} el valor promedio de la diversidad dentro de las procedencias. La proporción de la diversidad existente dentro de las procedencias se calcula de la forma siguiente: H_{pop} / H_{sp} (Wilson *et al*, 1997; Weising *et al*, 1995).

2.4.3. Comparación de los métodos usados para estimar la variabilidad genética

Los niveles de variabilidad pueden ser estimados mediante caracteres morfológicos, sus respuestas a la selección y sus antecedentes genéticos pueden ser estudiados, y de esta forma hacer inferencias sobre las fuerzas de selección y las correlaciones genéticas.

Contrario a los marcadores moleculares, los caracteres morfológicos son sin embargo, muchas veces influenciados en forma intensa por el ambiente, y consecuentemente los programas de investigación y los diseños de las investigaciones, tienen necesariamente que distinguir entre la variación fenotípica y la genotípica. Mas aún, para el caso de especies pequeñas como plantas sin flores (p.e. musgos y algas) como también hongos, es muy frecuente encontrarse con la dificultad de encontrar un número suficiente de caracteres morfológicos para un estudio comprensivo de la sistemática. Los métodos moleculares, por otro lado, proveen un número ilimitado de potenciales marcadores (Weising *et al*, 1995).

2.4.4. Utilización de los marcadores moleculares

Durante las pasadas décadas, las estrategias clásicas de evaluación de la variabilidad genética mediante comparación de las semejanzas en el ámbito anatómico, morfológico, embriológico y fisiológico, se han venido incrementando y complementando con técnicas moleculares. Estas incluyen el análisis de constituyentes bioquímicos y, lo más importante, la caracterización de macromoléculas. El desarrollo de los llamados “marcadores moleculares,” los cuales se basan en los polimorfismos encontrados en proteínas o ADN, ha facilitado investigaciones en una variedad de disciplinas como lo son, la taxonomía, filogenia, ecología, genética y mejoramiento de plantas. (Weising, *et al*, 1995).

Los marcadores moleculares tienen aplicación inmediata en el apoyo a los programas de mejoramiento genético de las especies latifoliadas tropicales y las especies no industriales, en especial en los estudios taxonómicos y en la investigación sobre los sistemas de cruzamiento. Otra aplicación potencialmente útil de los marcadores moleculares es la cuantificación de la variabilidad genética como apoyo a las estrategias de muestreo para promover la conservación genética y mejorar las poblaciones de nuevas especies industriales y no industriales (Haines 1994).

Las ventajas de los marcadores moleculares es que son; fenotípicamente neutros, pues no son afectados por el medio ambiente, se pueden evaluar un número indeterminado de ellos, se puede analizar toda la planta o parte de ella, pueden ser evaluados desde que la

planta está en sus primeros estados de desarrollo y aparentemente no muestran epistasis (Phillips *et al*, 1995).

De acuerdo con Hamrick (1992); la rápida identificación de la extensión de la variación genética dentro y entre poblaciones usando marcadores moleculares, es de valor para las actividades de conservación genética y para el desarrollo de poblaciones mejoradas.

Con los marcadores moleculares podemos lograr éstos propósitos, evitando los obstáculos que encontramos en los ensayos cuantitativos, como son, los efectos ambientales, dificultades para calcular parámetros de diversidad genética, y la necesidad de varios años de crecimiento antes de que muchas pruebas sean evaluadas. Los marcadores genéticos pueden ser probados al azar sobre una amplia variedad de genes funcionales, y la variación genética es medida por el porcentaje de loci donde existen polimorfismos, y la expectativa de heterocigotidad bajo el equilibrio de Hardey-Weinberg (Loveless, 1992).

Luego de la identificación del marcador genético y del análisis del material experimental, se obtiene un arreglo de genotipos para cada una de las muestras evaluadas de una población. La cantidad de individuos en una población que contengan el mismo genotipo en ciertos *locus*, se divide por el total del número de individuos en la población; esto da lo que se conoce como frecuencia genotípica relativa. La frecuencia genotípica es evaluada para todos los genotipos marcados en ese *locus*. De la misma manera se pueden estimar las frecuencias alélicas relativas. Las frecuencias alélicas y genotípicas son utilizadas para calcular parámetros como la variación dentro de poblaciones, diferencias entre poblaciones y heterocigotidad (Papageorgiou, 1997).

2.5 Evaluación de la diversidad de *Swietenia spp.* y otras meliáceas

Chalmers *et al* (1994), evaluaron la extensión de la variación genética de ocho especies de Meliáceas provenientes de cuatro géneros, por medio de la amplificación al azar de polimorfismos de ADN (RAPDs). Se detectaron polimorfismos entre y dentro de las muestras analizadas. Encontraron una clara separación entre el género *Cedrelela* y los géneros *Lovoa*, *Khaya* y *Swietenia*. En lo referente al género *Swietenia*, se demostró

consistentemente que las especies *S. macrophylla*, *S. humilis* y *S. mahagoni*, están estrechamente relacionadas entre sí.

Wilson *et al.* (1997), investigaron la diversidad genética de poblaciones de caoba dentro y entre las siguientes zonas geográficas: a) Península de Yucatán: Belice, Petén (Guatemala) y Quintana Roo (México); b) Zona Central: Honduras, Nicaragua y norte de Costa Rica; c) Guanacaste (Costa Rica) y d) Darién (Panamá), tomando como base para el estudio muestras de hojas de árboles existentes en los bosques naturales dentro de las respectivas zonas geográficas. Los autores consideraron que las diferencias genéticas responden a la selectividad producidas por las variables macroambientales y/o al aislamiento que pudiese encontrarse entre diferentes partes geográficas dentro del rango de distribución de la especie.

2.6 Descripción de la metodología RAPDs

Welsh y McClelland (1990) y Williams *et al.* (1990), informan que la técnica RAPDs, consiste en el uso de un oligonucleótido corto de secuencia arbitraria (llamado "*primer*", iniciador o cebador), para cebar la amplificación de fragmentos de ADN por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). El oligonucleótido puede cebar la amplificación a partir de un molde genómico uniéndose a sitios específicos en las hebras opuestas del ADN molde. Si existen diferencias en una o ambas hebras donde deben insertarse los cebadores, se da como resultado la no amplificación de la banda. RAPDs, es un tipo de marcador dominante, o sea que la aparición de una banda implica que existe una homología con el cebador usado, todos los demás alelos que no son homólogos al sitio de unión con el cebador, estarán representados por la ausencia de la banda. El cebador regularmente amplifica varias bandas, cada una originándose en diferentes sitios del genoma.

La naturaleza de los fragmentos amplificados está fuertemente influenciada por las secuencias del ADN molde y las del cebador. Los fragmentos son separados sobre geles de agarosa y coloreados con bromuro de etidio. Los cebadores comúnmente usados son de 10 nucleótidos de longitud, con un contenido de por lo menos un 50 % de citocina-guanina. La

técnica RAPDs permite tener virtualmente un número ilimitado de marcadores, y pueden ser realizados rápidamente con pocas restricciones de laboratorio.

2.7 Estimación de los índices de similitud y distancias genéticas

Los resultados experimentales en un ensayo biológico en donde se utilicen enzimas, proteínas, RFLPs o RAPDs son los mismos; un conjunto de bandas coloreadas en el gel que representan el comportamiento de la variabilidad. El problema es como cuantificar las bandas y una vez cuantificadas, proponer medidas estadísticas que expresen la variabilidad entre las colectas en estudio (Martínez 1995).

La presencia/ausencia de cada fragmento marcado es registrada en una matriz binaria y de esta forma se determina la frecuencia de las bandas en cada población. Existen diferentes procedimientos de análisis dentro de los cuales uno de los más usados es el coeficiente de similitud de Jaccard, que se calcula con base a los datos provenientes de la matriz binaria usando la siguiente fórmula:

$$F = M_{xy} / (M_t - M_{xyo})$$

Donde M_{xy} representa la proporción de fragmentos que dos accesiones tienen en común, M_t el número total de bandas en los datos de la matriz y M_{xyo} , el número de bandas presentes sólo en un individuo, la medida de la distancia genética es calculada como $1-F$ (Virk *et al.* 1995).

De forma análoga, el índice de diversidad de Shannon: $H_o = \sum P_i * \log_2 P_i$ (en donde P_i es la frecuencia del marcador RAPD), tiene un amplio rango de aplicaciones en ecología, y se puede utilizar para calcular la diversidad genética presente en poblaciones separadas y para la división de la diversidad entre y dentro de los componentes de la población (Weising *et al.*, 1995; Gillies *et al.*, 1997; Wilson *et al.*, 1997).

La distancia genética es una medida que expresa la divergencia entre dos poblaciones, razas o colectas, divergencia atribuible exclusivamente a un gen o a un conjunto de los mismos (Martínez 1995). Se han propuesto diferentes medidas de distancia genética, como las de Rogers, Prevosti, Cavali-Sforza, Nei, etc.; para lo cual se han considerado aspectos matemáticos, geométricos y biológicos.

2.8 Conglomerados

El análisis de conglomerados es una herramienta mediante la cual se forman agrupaciones entre un conjunto de individuos estudiados, de tal manera que se puedan hacer inferencias estadísticas sobre la base de las semejanzas o diferencias dentro y entre los grupos generados por el análisis (Martínez, 1995).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Metodología

La presente investigación se dividió en dos fases, una en el laboratorio y la otra en el campo. En ambas se buscaba evaluar la diversidad genética de seis procedencias de caoba del área de Centroamérica y México. En el Cuadro 1 se anotan las principales actividades desarrolladas en cada lugar.

Cuadro 1 Actividades de laboratorio y campo realizadas para estudiar la diversidad genética de caobas, de seis procedencias del área de Centroamérica y México

Ensayo Molecular (Laboratorio)	Ensayo Cuantitativo (Vivero)
1. Germinación de las semillas y traspaso de plántulas a bolsas individuales	1. Preparación del material vegetal
2. Extracción y aislamiento del ADN	2. Establecimiento del ensayo según diseño experimental
3. Determinación de la calidad y concentración del ADN	3. Toma de datos
4. Selección de <i>Primers</i> polimórficos y amplificación de los fragmentos de ADN	4. Análisis estadístico de los datos (SAS)
5. Lectura y registro de los productos de la amplificación	
6. Análisis de los datos	

3.2. Ensayo Molecular

El ensayo molecular se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Biotecnología del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE),

ubicado en Turrialba, Costa Rica. La duración de ésta fase estuvo comprendida entre el 16 de febrero y el 11 de agosto de 1998.

3.2.1. Material Vegetal

Cuarenta y un familias de caoba (*S. macrophylla*) almacenadas en el Banco de Semillas Forestales del CATIE y pertenecientes a poblaciones naturales de seis procedencias del área de Centroamérica y México, fueron sembradas a partir de semillas previamente colectadas por el Proyecto “Determinación de la diversidad genética de especies arbóreas tropicales de importancia económica y ecológica en Centro América y el Caribe” (Wilson *et al*, 1997). Cada procedencia estuvo conformada por siete familias, a excepción de la procedencia Guatemala que debido a la baja disponibilidad de semillas se utilizaron solo seis. La ubicación geográfica de las familias utilizadas se presenta en el Cuadro 2 y se ilustra en la Figura 1 (se define como familia a los grupos de individuos que tienen uno o ambos progenitores en común).

3.2.2. Aislamiento del ADN

El ADN utilizado para esta fase de la investigación se aisló a partir de hojas frescas de caoba utilizando el protocolo de extracción CTAB (Wilson *et al*, 1997), modificado en el Laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Biotecnología del CATIE. Para cada uno de los genotipos se pesaron segmentos de hojas jóvenes y congeladas de 0.2 g, luego de colocarlos en un mortero se le añadió nitrógeno líquido para proceder a su maceración hasta obtener un polvo fino. El tejido macerado se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se le agregó 1000 µl de buffer de extracción (100 mM tris-HCl pH 8,0, 20 mM EDTA, 1,4M NaCl, 1% PVP-40T, 2% de CTAB (bromuro de hexadecyltrimethylamonio), para romper las membranas celulares y nucleares del tejido macerado y dejar expuestos los componentes celulares. Se adicionó a cada tubo eppendorf 1 µl de mercaptoetanol como antioxidante y se agitó. Las muestras fueron incubadas en Baño María a 65°C por 30 minutos. Seguidamente y luego de dejarlas enfriar a temperatura ambiente por 4 minutos, se adicionaron a las mismas 400 µl de Cloroformo: octan-1-isoamyl alcohol 24:1 v/v, con la finalidad de precipitar las proteínas y polifenoles, dejando el ADN en suspensión. Se

Cuadro 2 Ubicación regional del las familias de caoba (*S. macrophylla*) utilizadas en el estudio de variabilidad genética

Procedenc.	Familia	Provincia o Estado	Distrito o Cantón	Corregimiento o Municipio	Población	Alt. (1)	Lat. Norte	Log. Oeste	Prec. (2)	Temp. (3)	Meses Secos
México	1-1	Quin. Roo	Bacalar	Oton. P. B.	San Felipe	50	18.75	-88.35	1,300	25	4
México	1-2	Quin. Roo	Bacalar	Oton. P. B.	San Felipe	50	18.75	-88.35	1,300	25	4
México	1-3	Quin. Roo	Bacalar	Oton. P. B.	San Felipe	50	18.75	-88.35	1,300	25	4
México	1-4	Quin. Roo	Bacalar	Oton. P. B.	San Felipe	50	18.75	-88.35	1,300	25	4
México	1-6	Quin. Roo	Bacalar	Oton. P. B.	San Felipe	50	18.75	-88.35	1,300	25	4
México	1-7	Quin. Roo	Bacalar	Oton. P. B.	San Felipe	50	18.75	-88.35	1,300	25	4
México	1-14	Quin. Roo	Bacalar	Oton. P. B.	San Felipe	50	18.76	-88.50	1,300	25	4
Guatemala	3-41	Petén	Flores	Tikal	Tikal	250	16.85	-90.93	1,955	28	4
Guatemala	3-101	Petén	Flores	Tikal	Tikal	250	16.85	-90.93	1,955	28	4
Guatemala	3-131	Petén	Flores	Tikal	Tikal	250	16.85	-90.93	1,955	28	4
Guatemala	3-151	Petén	Flores	Tikal	Tikal	250	16.85	-90.93	1,955	28	4
Guatemala	3-152	Petén	Flores	Tikal	Tikal	250	16.85	-90.93	1,955	28	4
Guatemala	3-153	Petén	Flores	Tikal	Tikal	250	16.85	-90.93	1,955	28	4
Nicaragua	5-29	Raan	Bonanza	Mukuwas	Mukuwas	200	14.04	-84.50	2,750	23-24	3
Nicaragua	5-35	Raan	Bonanza	Mukuwas	Mukuwas	200	14.04	-84.50	2,750	23-24	3
Nicaragua	5-46	Raan	Bonanza	Mukuwas	Mukuwas	200	14.04	-84.50	2,750	23-24	3
Nicaragua	5-47	Raan	Bonanza	Mukuwas	Mukuwas	200	14.04	-84.50	2,750	23-24	3
Nicaragua	5-55	Raan	Bonanza	Mukuwas	Mukuwas	200	14.04	-84.50	2,750	23-24	3
Nicaragua	5-56	Raan	Bonanza	Mukuwas	Mukuwas	200	14.04	-84.50	2,750	23-24	3
Nicaragua	5-64	Raan	Bonanza	Mukuwas	Mukuwas	200	14.04	-84.50	2,750	23-24	3
Costa Rica	6-43	Alajuela	Los Chiles	El Parque	Cño Negro	55	10.95	-84.71	2,885	24	3
Costa Rica	6-45	Alajuela	Los Chiles	El Parque	Cño Negro	55	10.95	-84.71	2,885	24	3
Costa Rica	6-46	Alajuela	Los Chiles	El Parque	Cño Negro	55	10.95	-84.71	2,885	24	3
Costa Rica	6-49	Alajuela	Los Chiles	El Parque	Cño Negro	55	10.95	-84.71	2,885	24	3
Costa Rica	6-61	Alajuela	Los Chiles	El Parque	Playuelas	35	10.93	-84.69	2,885	24	3
Costa Rica	6-73	Alajuela	Los Chiles	El Parque	Marabama	45	10.95	-84.66	2,885	24	3
Costa Rica	6-87	Alajuela	Los Chiles	El Parque	SanEmilio	30	10.97	-84.77	2,885	24	3
Costa Rica	6-122	Puntarenas	Sardinal	Sardinal	Abangares	50	10.06	-84.49	1,940	27	5
Costa Rica	6-137	Guanacast.	La Cruz	Sta Rosa	Pocosol	270	10.53	-85.36	1,510	26	6
Costa Rica	6-143	Guanacast.	La Cruz	Sta Rosa	Pocosol	270	10.53	-85.36	1,510	26	6
Costa Rica	6-156	Guanacast.	La Cruz	Sta Rosa	Pocosol	270	10.89	-85.60	1,510	26	6
Costa Rica	6-243	Puntarenas	Sardinal	Sardinal	Chapernal	50	10.07	-84.83	1,940	27	5
Costa Rica	6-249	Puntarenas	Sardinal	Sardinal	Chapernal	50	10.07	-84.83	1,940	27	5
Costa Rica	6-250	Puntarenas	Sardinal	Sardinal	Chapernal	50	10.07	-84.83	1,940	27	5
Panamá	7-3	Darién	Seteganti	La Palma	Quintín	320	8.26	-77.27	2,500	26	n.r.
Panamá	7-9	Darién	Seteganti	La Palma	Quintín	240	8.25	-78.10	2,500	26	n.r.
Panamá	7-10	Darién	Seteganti	La Palma	Quintín	340	8.20	-78.09	2,500	26	n.r.
Panamá	7-12	Darién	Seteganti	La Palma	Pta Alegre	10	8.26	-78.01	2,500	26	n.r.
Panamá	7-33	Colón	Gatún	Gatún	Gatún	50	9.27	-79.92	2,500	25	n.r.
Panamá	7-35	Panamá	Paraíso	Paraíso	Paraíso	50	9.03	-79.63	2,500	25	n.r.
Panamá	7-37	Panamá	Ancon	Ancon	Summit	50	9.06	-79.64	2,500	25	n.r.

Quin. Roo = Quintana Roo

Guanacast. = Guanacaste

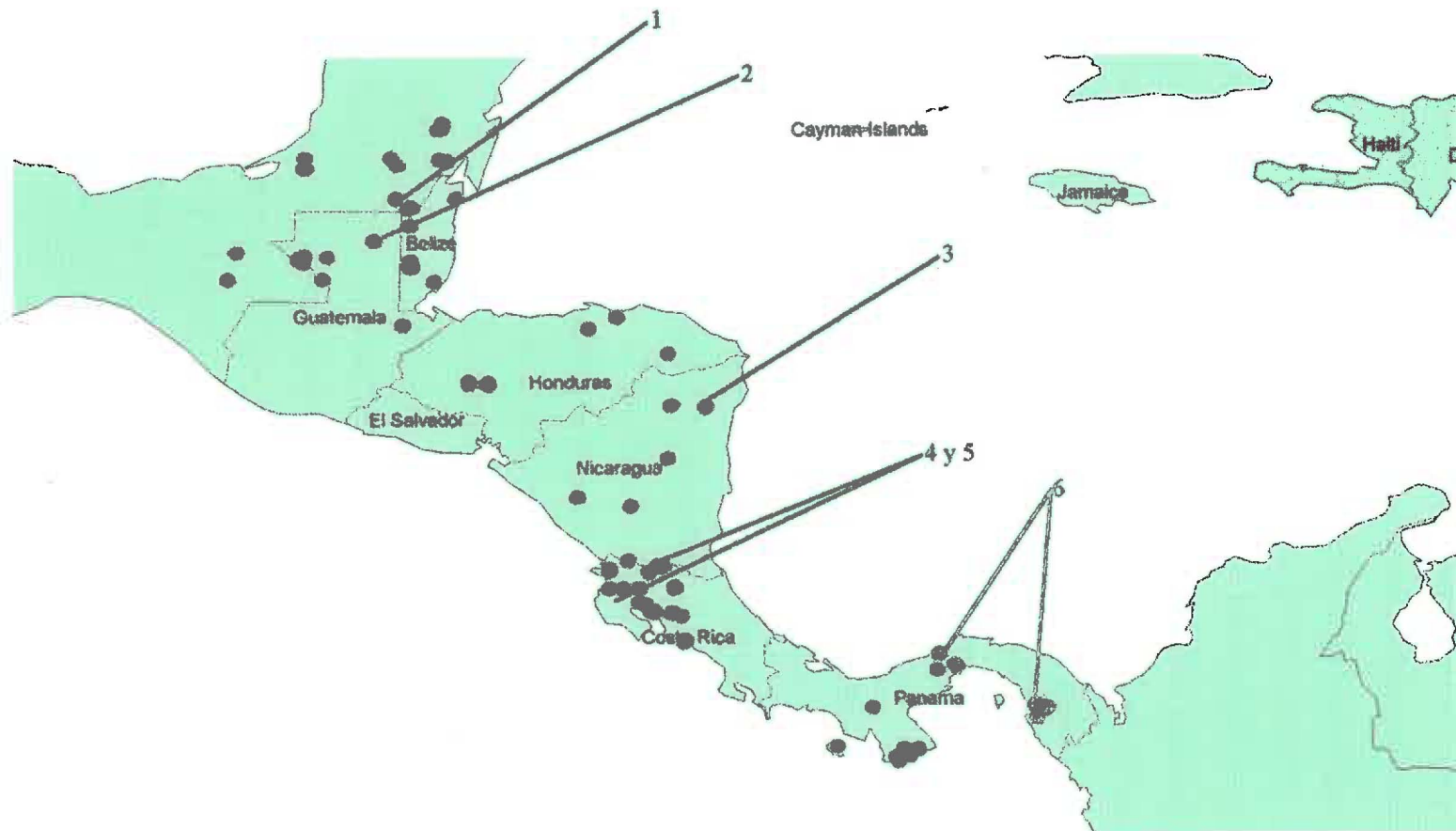
1. Alt. = Altura (en metros sobre el nivel del mar)

2. Prec. = Precipitación anual promedio (en milímetros)

3. Temp. = Temperatura anual promedio (en grados centígrados)

n. r. = no reportado

Tomado de: Navarro C. y Hernández M. Base de datos del Proyecto de Mejoramiento Genético de caoba. CATIE, 1997



1. México (Quintana Roo)
2. Guatemala (Tikal)
3. Nicaragua (Bonanza)
4. Costa Rica Zona Central Norte (Los Chiles)
5. Costa Rica Pacífico Seco (Sardinal, Santa Rosa)
6. Panamá (Quintín, Gatún, Paraíso)

Figura 1 Áreas donde han sido seleccionados árboles de caoba y se ha colectado material de herbario, semillas y hojas para estudios del ADN. (Tomado de Wilson *et al*, 1997).

agitaron las muestras con un vortex y luego se microcentrifugaron a 13,000 r.p.m. por cinco minutos (este último procedimiento se realizó dos veces). Los sobrenadantes resultantes en las muestras después de la microcentrifugación se transfirieron a tubos limpios. Con la ayuda de una micropipeta, se rellenaron los tubos con Isopropanol (-20°C), se mezclaron ligeramente y se dejaron en el congelador durante 60 minutos para precipitar el ADN. Luego de precipitado el ADN, se procedió a microcentrifugar a 13.000 r.p.m. durante cinco minutos, dando como resultado la formación de un pellet de ADN. El sobrenadante de esta última centrifugación se eliminó mediante decantación y se adicionó al pellet 1 ml de buffer de lavado (76% ethanol y 10mM de acetato de amonio) para precipitar las sales que pudiesen contaminar y degradar el ADN y a la vez eliminar los residuos de la solución extractora CTAB. Luego se dejaron reposar las muestras por 20 minutos. Se escurrieron los tubos boca abajo sobre papel toalla hasta eliminar totalmente el alcohol, y se resuspendieron los pellets añadiendo 100 µl de TE (10mM Tris-HCl pH 8,0 1mM EDTA). Luego las muestras fueron almacenadas a - 20°C para su posterior utilización. El protocolo de extracción CTAB, se presenta en el Apéndice 1 paso por paso.

3.2.3. Determinación de la calidad y concentración del ADN

La determinación de la calidad del ADN extraído se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %. Este método se basa en la cuantificación de la fluorescencia producida por el complejo bromuro de ethidio-ADN y visualizada mediante el uso de luz ultravioleta, de manera tal que una muestra de concentración desconocida, es comparada con un patrón o testigo de concentración conocida, luego de someterlas a electroforesis. La intensidad de la fluorescencia visualizada por la luz ultravioleta es proporcional a la cantidad de ADN que se encuentra en la muestra que se evalúa, y comparando esta con el patrón o testigo se estima la concentración del ADN que contiene la misma. La cuantificación de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa (Apéndice 2), es recomendada para muestras en donde se obtienen bajas cantidades de ADN e igualmente cuando el ADN obtenido resulta contaminado con proteínas, fenoles o ARN (Weising *et al*, 1995).

3.2.4. Selección de *primers* y amplificación de los fragmentos de ADN

Se evaluaron un total de 86 *primers* con la finalidad de detectar polimorfismos (Apéndice 3). La selección de los *primers* polimórficos se hizo a partir de la evaluación de los mismos sobre una muestra de cinco familias (1-1, 3-101, 5-46, 6-156 y 7-33), seleccionadas porque representaban la variabilidad genética del material en estudio. Se seleccionaron aquellos *primers* que revelaron polimorfismos claros, y seguros (*primers* que reflejaron mayor nitidez y repetitividad), siempre y cuando estas bandas polimórficas no correspondieran a los extremos, por no ser confiables. En el Cuadro 4, se presentan los *primers* polimórficos, con sus respectivas secuencias de nucleótidos.

Para la amplificación del ADN, se utilizó un termociclador PCR system 9600 de la PERKIN ELMER, se utilizó un programa para PCR consistente en un *primer* ciclo de 3 minutos a 94 °C, seguido de 45 ciclos compuestos por: 30 segundos a 94 °C (desnaturalización), 45 segundos a 36 °C (unión *primer*-ADN), y 2 minutos a 72 °C (extensión). Se utilizaron *primers* de la marca Operon y *primers* sintetizados en la UBC (Universidad Columbia Británica). Las muestras para la amplificación fueron preparadas a un volumen final de reacción de 25 µl. Cada tubo listo para su reacción final de PCR, estuvo compuesto por los siguientes reactivos; 0,30 mM de cada dinucleótido (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), obteniéndose 1,2mM en la mezcla de los dinucleótidos, 3,33 U de Taq (AmpliTaq ® DNA Polymerase, Stoffel Fragment), 12 mM de Tris HCl, 12mM de KCl, 3,5mM de MgCl₂ y entre 0,16 y 0,9 µM de *primer*.

Cuadro 3 Secuencia de nucleótidos de los *primers* polimórficos utilizados en el estudio de variabilidad genética de procedencias de caoba

Primer	Secuencia	Número de bandas polimórficas	Concentración μM
OPA-7	5'-GAAACGGGTG-3'	7	0,9
OPA-13	5'-CAGCACCCAC-3'	2	0,3
OPB-7	5'-GGTGACGCAG-3'	5	0,9
OPH-12	5'-ACGCGCATGT-3'	3	0,7
OPH-14	5'-ACCAGTTGG-3'	2	0,7
OPH-15	5'-AATGGCGCAG-3'	1	0,7
OPH-17	5'-CACTCTCCTC-3'	4	0,8
UBC-72	5'-GAGCACGGGA-3'	1	0,2
UBC-101	5'-GCGGCTGGAG-3'	2	0,16
UBC-125	5'-GCGGTTGAGG-3'	1	0,2

3.2.5. Lectura y registro de los productos de la amplificación

Las lecturas de los productos de las amplificaciones del ADN de los materiales en estudio con cada uno de los *primers*, se realizaron evaluando las fotografías tomadas de los geles luego de la tinción de estos con bromuro de etidio y su subsecuente visualización bajo luz ultravioleta. Los polimorfismos se detectaron evaluando los patrones de bandas obtenidos para cada individuo.

El registro de los datos se realizó comparando a todos los individuos entre sí, tomando en consideración la presencia o ausencia de cada banda en particular, codificando con (1) la presencia de la banda y con (0) la ausencia de la banda. De esta información se generaron tablas o matrices de presencia/ausencia (para cada uno de los *primers* por separado), lo que permitió evaluar a todos los individuos entre sí, para el posterior cálculo de distancias genéticas.

3.2.6. Análisis de los datos moleculares

A partir de los registros obtenidos de la lectura de las bandas polimórficas (presencia/ausencia) y con la utilización de los programas computacionales como:

POPGENE (Yeh *et al*, 1997), WINAMOVA (Excoffier *et al*, 1992), SAS (Sas Institute, 1988) y MEGA (Kumar *et al*, 1993), se procedió realizar el análisis de los datos (procedimiento que es resumido en la Figura 2) como se describe a continuación;

1. Los polimorfismos se registraron en formularios donde se especificó claramente el nombre del *primer*, las bandas polimórficas encontradas en cada *primer* y las familias analizadas (Apéndice 4).

2. Los datos registrados en los formularios fueron introducidos en los programas computacionales en donde por defecto (ajuste automático) produjeron una matriz binaria para la comparación de los polimorfismos entre todas las familias.

3. Se estimó mediante la prueba de Chi Cuadrado, la significancia estadística de las frecuencias de las bandas polimórficas con la finalidad de determinar cuáles bandas fueron las que aportaron más al estudio de la variabilidad (Sas Institute, 1988, Yeh *et al*, 1997).

4. Se calculó el índice de Shannon, como herramienta para cuantificar los niveles de diversidad genética presentes entre las procedencias y también para descomponer los niveles de diversidad dentro y entre procedencias. La base matemática para el cálculo del índice de Shannon es la siguiente:

$$H_o = -\sum P_i * \text{Log}_2 P_i$$

Donde P_i es la frecuencia fenotípica.

Los componentes de diversidad entre las procedencias se calcularon mediante la fórmula:

$$\text{Diversidad entre las procedencias} = (H_{sp} - H_{pop}) / H_{sp}$$

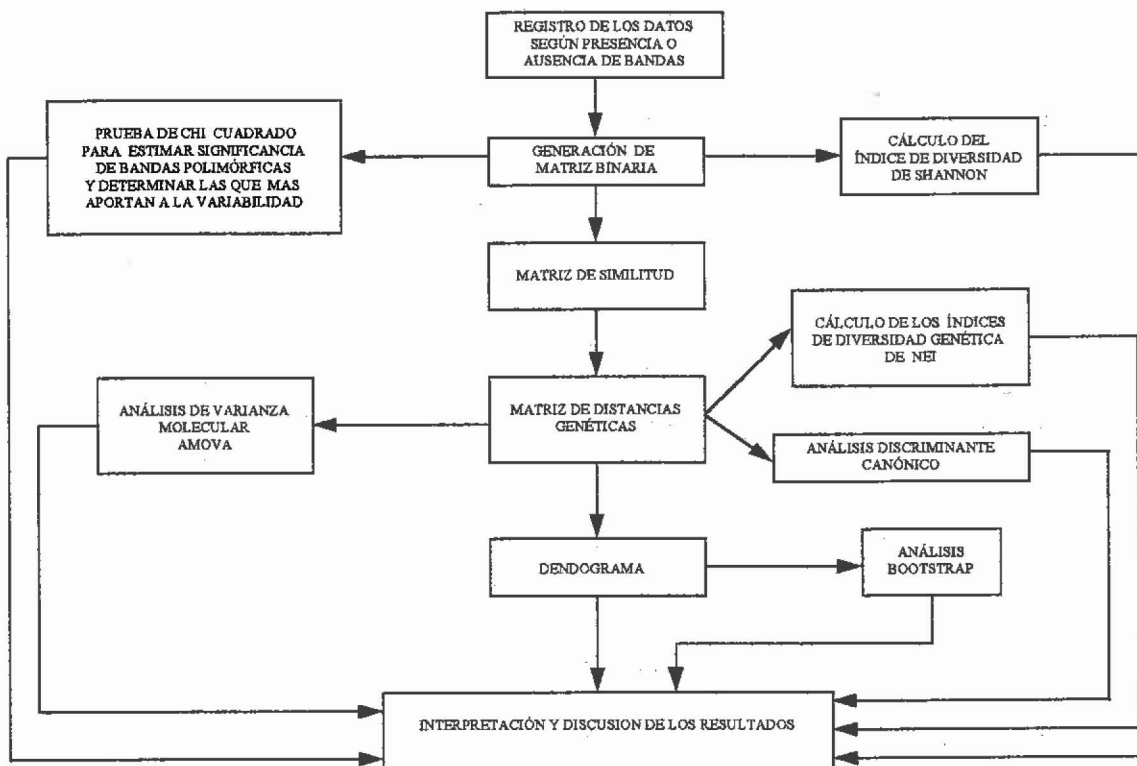


Figura 2. Flujo de las etapas seguidas en el análisis del ensayo molecular de variabilidad genética de caobas provenientes de Centroamérica y México. CATIE, 1998.

En donde H_{sp} representa el total de la diversidad detectada en todas las procedencias, y H_{pop} el valor promedio de la diversidad dentro de las procedencias.

La proporción de la diversidad existente dentro de las procedencias se calcula de la forma siguiente:

$$\text{Diversidad dentro de las procedencias} = H_{pop} / H_{sp}$$

En donde H_{sp} representa el total de la diversidad detectada en todas las procedencias, y H_{pop} el valor promedio de la diversidad dentro de las procedencias (Wilson *et al*, 1997, Weising *et al*, 1995, Yeh *et al*, 1997).

5. Se procedió a partir una matriz de similitud genética generada mediante el programa POPGENE, a determinar el índice de diversidad genética de Nei, el cual distribuye la diversidad genética total (H_t) en componentes que representan la diversidad dentro de las procedencias (H_s) y entre las procedencias (D_{st}), de manera tal que:

$$H_t = H_s + D_{st}$$

Este método se basa en las similitudes existentes entre dos genes elegidos al azar dentro y entre poblaciones, independientemente del número de alelos existentes en los mismos. Las probabilidades de similitud (J) y diferencia (H) entre dos genes seleccionados al azar en una población está dada por: $J = \sum_k x_k^2$, y $H = 1 - J$, respectivamente ($x_k^2 = a$ la frecuencia del gen x , al cuadrado) (Nei, 1973).

El coeficiente de diferenciación genética (G_{st}), se calculó dividiendo D_{st} / H_t .

6. Se estimó el número relativo de migrantes por generación a través del flujo de genes mediante la fórmula siguiente: $N_m = 0,25 (1 - G_{st}) / G_{st}$, en donde N_m representa el flujo de

genes. El cálculo del flujo de genes se basa en la distribución de los alelos raros presentes en la población.

7. Las estimaciones de los componentes de las varianzas dentro y entre procedencias se calcularon utilizando el programa WINAMOVA (Excoffier *et al*, 1992). WINAMOVA estima la significancia de los componentes de las varianzas mediante permutaciones, sin considerar los supuestos de normalidad que son convencionales en los análisis de varianza regulares, ya que éstos supuestos son inapropiados para los datos moleculares (Excoffier *et al*, 1992).

8. Se realizó un análisis de conglomerados con el método WARD de conglomeración. Los resultados del análisis de conglomerados se sometieron a un análisis discriminante canónico para estimar el aporte de las variables en las clasificaciones de las familias dentro de los grupos (Sas Institute, 1988).

9. Mediante los programas computacionales MEGA (Kumar *et al*, 1993) y POPGENE (Yeh *et al* 1997), se generaron dos dendogramas con el método UPGMA, uno para estudiar los grupos que se formaron al comparar todas las familias entre sí y el segundo, para evaluar las asociaciones existentes entre las procedencias en función de sus distancias genéticas.

10. Se utilizó el procedimiento "Bootstrap" del programa computacional MEGA (Kumar *et al*, 1993), para estudiar los intervalos de confianza existentes dentro de los diferentes grupos formados en el dendograma. El análisis Bootstrap consiste en la toma de muestras (con reemplazamiento) de los elementos que constituyen la muestra original. El remuestreo para calcular el valor promedio de los intervalos de confianza de los grupos se hizo con base en 1.000 repeticiones.

3.3 Ensayo Cuantitativo

El ensayo cuantitativo se desarrolló en el área del vivero del Proyecto de Mejoramiento Genético Forestal del CATIE, ubicado en la finca Cabiria, en Turrialba, Costa Rica entre el 17 de noviembre de 1997 y el 3 de marzo de 1998.

3.3.1. Preparación del material

La siembra de los materiales se realizó el día seis de octubre de 1997. El sustrato utilizado en el semillero fue arena limpia, tamizada y desinfectada con una dilución de 50 ml formalina en 10 l de agua / carretilla de arena. La sementera se preparó sobre una de las mesas del invernadero del proyecto de Genética Forestal, ubicado en la finca Cabiria del CATIE, la misma se dividió en 42 secciones claramente rotuladas con los números de identificación de cada uno de las familias. Mientras transcurrió el período de germinación, se procedió a llenar las bolsas de 20 cm por 12 cm, con una mezcla de suelo- arena a razón de 2 : 1 en donde finalmente se trasplantaron las plántulas. Se seleccionaron al azar, con el uso de una tabla de números aleatorios, veinte plántulas por familia para su trasplante a las bolsas que fueron llevadas finalmente al campo el día 17 de noviembre de 1997.

3.3.2. Diseño experimental

Se utilizó para este ensayo un diseño de tratamientos completamente al azar con treinta y dos tratamientos y veinte repeticiones por tratamiento, donde cada tratamiento correspondió a una familia de las procedencias estudiadas, totalizando seiscientos cuarenta unidades experimentales. En el Cuadro 4 se aprecia la identificación de los tratamientos.

Cuadro 4 Procedencias y familias evaluadas en el ensayo cuantitativo de diversidad genética de caoba.

Procedencias	Familias
1. México, (Quintana Roo)	1-1, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6.
2. Guatemala, (Petén)	3-101, 3-131, 3-151, 3-152, 3-153
3. Costa Rica, (Zona central norte)	6-43, 6-45, 6-46, 6-49, 6-61, 6-73, 6-87
4. Costa Rica, (Pacífico seco)	6-122, 6-137, 6-143, 6-156, 6-243, 6-250
5. Panamá, (Este)	7-3, 7-9, 7-10, 7-11, 7-12, 7-33, 7-35, 7-37

Tomado de: Navarro, C. y Hernández, M. Base de datos del Proyecto de diversidad genética de caoba. CATIE, 1997.

Las unidades experimentales se distribuyeron en un área de 218,9 metros cuadrados, donde no se vieron afectados por diferencias de sombra ni vientos fuertes. El sorteo de los tratamientos en el campo se realizó con la utilización de una tabla de números aleatorios, y las unidades experimentales se distribuyeron equidistantemente a una distancia de un pie (30,4 cm.)

El modelo estadístico para los efectos fijos (comparación entre familias) del diseño experimental;

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_k, \text{ donde:}$$

Y_{ij} = Observación individual

μ = Media común

τ_i = Efecto de la i -ésima familia

ε_k = Error experimental

implica únicamente dos fuentes de variación (los tratamientos y el error) y una constante (μ). Este modelo permite el uso de un elevado número de tratamientos y un gran número de repeticiones, además que los grados de libertad del error experimental, son generalmente altos, de tal modo que se garantiza una buena precisión del experimento (Salazar, 1984)

En el caso de los efectos aleatorios (familias anidadas dentro de las procedencias) se utilizó el modelo siguiente:

$$\text{El modelo estadístico del diseño experimental; } Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_{i(j)} + \varepsilon_{(ij)k}, \text{ donde:}$$

Y_{ijk} = Observación individual

μ = Media común

τ_i = Efecto de la i -ésima familia

$\beta_{i(j)}$ = Efecto de la familia i-ésima familia anidada en la j-ésima procedencia

$\varepsilon_{(i)k}$ = Error experimental

Las variables evaluadas en este componente de la investigación fueron:

1. Altura (cm).
2. Diámetro de cuello del tallo (cm).
3. Biomasa de raíces (g).
4. Biomasa aérea (g).
5. Relación biomasa aérea / biomasa de raíces (g).

3.3.3. Análisis de los datos cuantitativos

El análisis de los datos cuantitativos se realizó con el apoyo del programa computacional SAS (Sas Institute, 1988), en el orden que se describe a continuación: (en la Figura 3 se resumen todas las etapas del análisis).

3.3.3.1. Registro de los datos.

Las observaciones realizadas a lo largo de esta etapa de la investigación fueron introducidas en una base de datos en donde se colocó a los tratamientos (familias) en las filas y a las diferentes variables en las columnas para su subsecuente introducción al programa de análisis estadístico SAS.

3.3.3.2. Prueba de normalidad

Como primer paso en el análisis estadístico, se sometieron los datos a una prueba de normalidad mediante el procedimiento PROC NORM del programa SAS, para verificar que los datos cumplieran con el supuesto de normalidad requerido en el análisis de varianza.

3.3.3.3. Análisis de varianzas

Se realizaron los análisis de varianza mediante el procedimiento GLM de SAS con los tratamientos (familias) anidados dentro de sus respectivas procedencias, para estimar la

variabilidad genética existente en cada una de ellas. Se estimó también la variabilidad genética entre las procedencias mediante el análisis de varianza de todos los tratamientos (familias) entre sí.

3.3.3.4. Heredabilidad

La heredabilidad es la proporción del total de la varianza debida a factores genéticos. En el sentido amplio, se define como la proporción total de la varianza debida a todos los factores genéticos. En el sentido estricto, es la proporción del total de la varianza debida a los genes con efectos aditivos, es el mayor indicador de la superioridad que puede ser transmitida por semilla (Wright, 1976).

El cálculo de la heredabilidad, se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$h^2 = 4 (\sigma^2_{fam}) / \sigma^2_{fam} + \sigma^2_{error}$$

La desviación estándar de la heredabilidad (σ_h), se estimó mediante la fórmula:

$$\sigma_h = (1-h_f^2/4) [1+(NB-1)h_f^2/4] / [(NB/2)(NB-1)(F-1)]^{1/2}$$

Donde : h^2 = heredabilidad

N = número de árboles por parcela

B = número de repeticiones

F = número de familias

Se estimó también el Coeficiente de Variación genética Aditiva (CVGA), para conocer la cuota porcentual de la variabilidad respecto a la media de cada variable mediante la siguiente fórmula:

$$CVGA = \sigma_a / \bar{x}$$

Donde σ_a = la raíz cuadrada de 4 (σ_{fam}^2)

\bar{x} = promedio de la población

Se calculó la heredabilidad usando el procedimiento VARCOMP de SAS (SAS Institute, 1988).

3.3.3.5. Comparación múltiple de medias

Se realizaron las comparaciones de las medias de las familias que resultaron estadísticamente significativas, mediante la prueba de Tukey con SAS (SAS Institute, 1988) (La Figura 3 resume las etapas seguidas en el análisis del ensayo molecular).

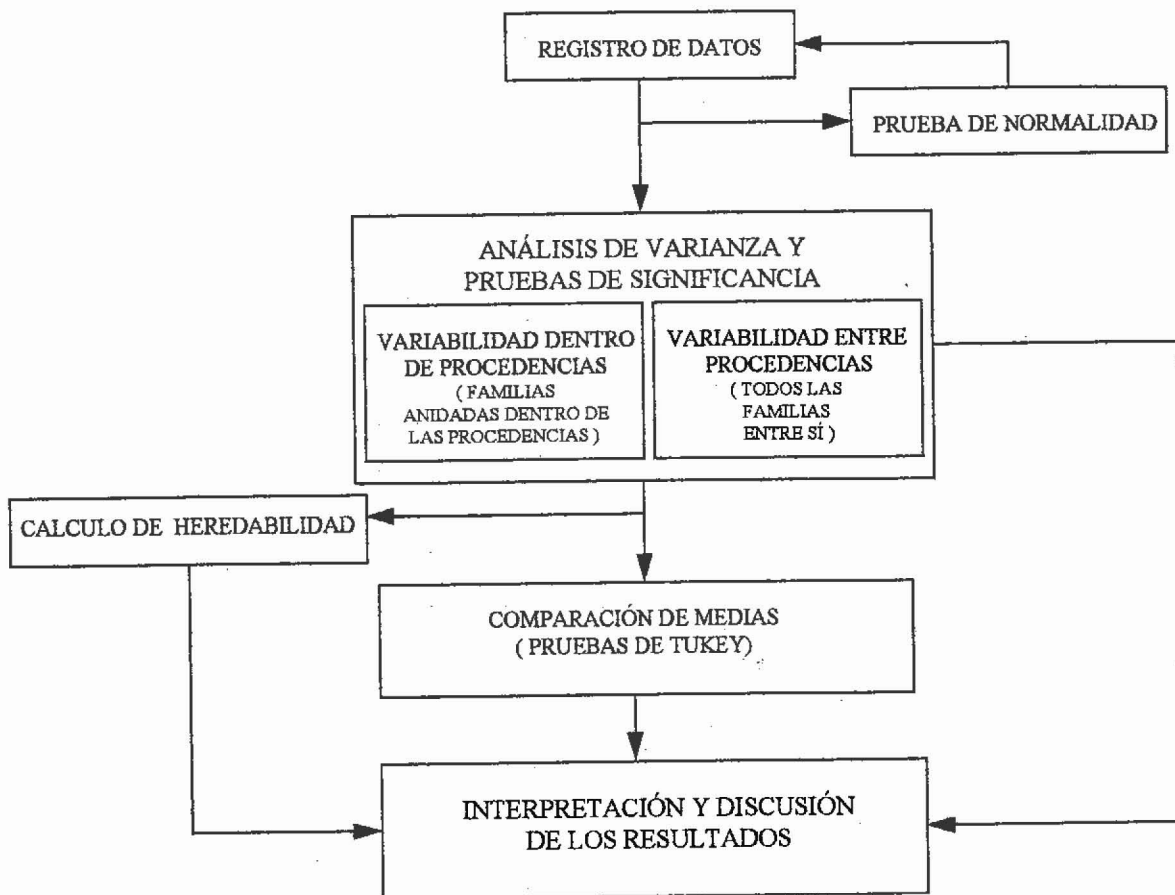


Figura 3. Flujo de las etapas seguidas en el análisis del ensayo cuantitativo de variabilidad genética de caoba provenientes de Centroamérica y México. CATIE, 1988

4. RESULTADOS

4.1 Ensayo molecular

4.1.1. Resultados del aislamiento del ADN

Los rendimientos de las extracciones de ADN utilizando la metodología de extracción CTAB (Wilson *et al*, 1993), produjeron entre 400 y 1.200 ng/ml. El Cuadro 5 presenta los rendimientos de ADN de las diferentes familias usadas en el estudio.

Cuadro 5 Rendimiento de la extracción de ADN para las familias de *S. macrophylla* sujetas a estudio mediante el método CTAB modificado. CATIE, 1998.

Familia	Rendimiento (ng de ADN)	Familia	Rendimiento (ng de ADN)
1-1	800	6-45	800
1-2	800	6-46	1.200
1-3	900	6-49	800
1-4	1.000	6-61	1.000
1-6	900	6-73	800
1-7	800	6-87	900
1-14	1.200	6-122	900
3-41	1.200	6-137	600
3-101	1.000	6-143	1.200
3-131	600	6-156	800
3-151	1.000	6-243	1.000
3-152	500	6-249	800
3-153	1.200	6-250	400
5-29	1.000	7-3	1.000
5-35	1.100	7-9	900
5-46	1.100	7-10	800
5-47	1.100	7-12	1.100
5-55	1.000	7-33	1.000
5-56	1.000	7-35	900
5-64	1.000	7-37	700
6-43	1.100		

4.1.2. Análisis de los fragmentos RAPDs

Luego de la exclusión de las bandas que no estaban claramente definidas (sobre todo en los extremos) y las bandas monomórficas para todas las familias en estudio, se encontraron un total de 28 bandas polimórficas, generadas a partir de 10 *primers*. Los números de bandas polimórficas encontradas estuvieron en el rango de una para los *primers* H-15, UBC-72 y UBC-125 y siete, en el caso del *primer* A-7, el Cuadro 6 presenta el número de bandas amplificadas y el número de bandas polimórficas por *primer*.

Cuadro 6 Secuencias de los diez *primers* utilizados, con el número de bandas amplificadas y el número de bandas polimórficas.

Primer	Secuencia	Número de bandas amplificadas	Número de bandas polimórficas
OPA-7	5'-GAAACGGGTG-3'	13	7
OPA-13	5'-CAGCACCCAC-3'	6	2
OPB-7	5'-GGTGACGCAG-3'	9	5
OPH-12	5'-ACGCGCATGT-3'	9	3
OPH-14	5'-ACCAGGTTGG-3'	4	2
OPH-15	5'-AATGGCGCAG-3'	10	1
OPH-17	5'-CACTCTCCTC-3'	9	4
UBC-72	5'-GAGCACGGGA-3'	10	1
UBC-101	5'-GCGGCTGGAG-3'	10	2
UBC-125	5'-GCGGTTGAGG-3'	11	1
Total		91	28

4.1.3. Prueba de Chi²

La prueba de Chi² fue utilizada para determinar la significancia de las frecuencias de las bandas polimórficas existentes en las procedencias estudiadas (Cuadro 7).

La información del Cuadro 7 indica que se encontraron 8 bandas (A7-2, A7-3, A7-5, A7-6, A7-7, B7-3, H15-1 y H17-2) que no tienen significancia estadística al nivel del 5 % de probabilidad. En términos estadísticos, estas bandas, no aportan ningún peso en la estimaciones de variabilidad genética, por lo tanto no fueron consideradas en el análisis molecular. Sin embargo, algunas bandas no significativas, se presentaron solamente en una procedencia en particular, como fue el caso de las bandas A7-2 y B7-3, asociadas a algunos individuos de la procedencia México, las bandas A7-6 y H17-2 asociadas a la procedencia

Costa Rica, Pacífico Seco y la banda A7-7 asociada a las procedencia Guatemala, las cuales pueden ser de valor para futuros estudios de variabilidad genética de familias dentro de las procedencias en las cuales se presentaron, ya que las mismas están discriminando individuos dentro las procedencias antes mencionadas. Las bandas restantes (A7-3 y A7-5), son bandas de baja frecuencia, y no se puede inferir nada acerca de ellas.

Cuadro 7 Probabilidad (0,05), de las frecuencias de las bandas polimórficas existentes en la investigación de variabilidad genética de procedencias de caoba. Prueba de X^2

Banda	Tamaño (pb)	Significancia	Banda	Tamaño (pb)	Significancia
A7-1	369	*	H12-1	246	*
A7-2	492	ns	H12-2	369	*
A7-3	615	ns	H12-3	492	*
A7-4	851	*	H14-1	369	*
A7-5	954	ns	H14-2	400	*
A7-6	450	ns	H15-1	246	ns
A7-7	985	ns	H17-1	123	*
A13-1	450	*	H17-2	546	ns
A13-2	369	*	H17-3	369	*
B7-1	600	*	H17-4	492	*
B7-2	340	*	UBC72-1	615	*
B7-3	615	ns	UBC101-1	780	*
B7-4	350	*	UBC101-2	325	*
B7-5	450	*	UBC125-1	492	*

pb = pares de bases

* Significancia al 0,05

4.1.4. Índices de diversidad

El índice de diversidad de Shannon, fué utilizado para calcular los componentes de diversidad genética entre y dentro de las procedencias evaluadas. Como se puede apreciar en el Cuadro 8, el promedio de la diversidad genética dentro de las procedencias (H_{pop}/H_{sp}), resultó ser mayor (59 %) que el promedio de la diversidad entre las procedencias ($H_{sp}-H_{pop}/H_{sp}$) (41 %).

Cuadro 8 Componentes de diversidad genética entre y dentro de las procedencias evaluadas mediante el índice de diversidad de Shannon

Primer	H_{pop} (1)	H_{sp} (2)	H_{pop}/H_{sp} (3)	$(H_{sp}-H_{pop})/H_{sp}$ (4)
A7-1	0,317	0,689	0,46	0,54
A7-4	0,225	0,679	0,33	0,67
A13-1	0,562	0,621	0,90	0,10
A13-2	0,150	0,653	0,23	0,77
B7-1	0,370	0,653	0,57	0,43
B7-2	0,295	0,593	0,50	0,50
B7-4	0,370	0,681	0,54	0,46
B7-5	0,106	0,290	0,37	0,63
H12-1	0,075	0,465	0,16	0,84
H12-2	0,256	0,525	0,49	0,51
H12-3	0,218	0,659	0,33	0,67
H14-1	0,297	0,574	0,52	0,48
H14-2	0,077	0,385	0,20	0,80
H17-1	0,114	0,224	0,51	0,49
H17-3	0,350	0,683	0,51	0,49
H17-4	0,168	0,692	0,24	0,76
UBC72-1	0,331	0,634	0,52	0,48
UBC101-1	0,446	0,456	0,98	0,02
UBC101-2	0,280	0,582	0,48	0,52
UBC125-1	0,502	0,615	0,82	0,18
Promedios	0,163	0,329	0,59	0,41

1, Diversidad total (todas las procedencias)

2, Promedio de la diversidad dentro de las procedencias

3, Proporción de la diversidad evidenciada dentro de las procedencias

4, Proporción de la diversidad evidente entre las procedencias

Hubo variación entre los *primers* en lo referente a la distribución de la diversidad dentro y entre las procedencias. Por ejemplo, con los *primers* UBC-101-1, A13-1 y UBC125-1, se logró detectar más del 80 % de la diversidad evidenciada dentro de las procedencias (H_{pop} / H_{sp}), mientras que el mismo monto de diversidad entre las procedencias ($(H_{sp} - H_{pop}) / H_{sp}$) se detectó con los *primers* H12-1 y H14-2.

Otra de las metodologías utilizada para estimar la variación existente dentro y entre las procedencias fué mediante el cálculo de los índices de diversidad genética de Nei (Nei, 1973), en donde el promedio de la diversidad genética total (H_t), para las procedencias estudiadas fué de 0,3059 +/- 0,03 y el índice promedio de diversidad dentro de las procedencias (H_s) resultó 0,1751 +/- 0,01. El índice promedio de diferenciación genética (G_{st}) obtenido de 0,4276, sugiere que el 43 % de la diversidad total se encuentra distribuída entre las procedencias, lo que coincide con el índice de Shannon (Cuadro 9).

Se obtuvo el valor relativo de la diversidad existente dentro de las procedencias mediante el índice de Nei, restando de uno, el valor del coeficiente de diferenciación genética ($1 - G_{st}$), resultado que representa la cantidad relativa de la variabilidad genética presente dentro de las procedencias, que en este caso resultó ser de 0,5724 (57 %).

La estimación del número de migrantes en las procedencias por generación con base a la distribución de los alelos raros fué de 0,4234, lo que sugiere que por cada generación salen y entran de las procedencias un promedio de 0,42 individuos.

Como se puede ver en el Cuadro 9, con ninguno de los *primers* se obtuvo un índice de diversidad total mayor de 0,49, por otro lado, los más bajos índices de diversidad total se manifestaron con los *primers* B7-5 y H17-1. Los mayores índices de diversidad encontrados dentro de las procedencias estuvieron entre 0,3178 y 0,3261, los cuales corresponden a los *primers* A7-1, A7-4 y B7-1, mientras que los índices mas bajos fueron de 0,0494 y 0,0813 mismos que corresponden a los *primers* H12-1 y B7-5 respectivamente.

Cuadro 9 Diversidad total (Ht), dentro de procedencias (Hs), y coeficiente de diferenciación genética (Gst). Según Nei (1973)

Primer	Ht (1)	Hs (2)	Gst (3)
A7-1	0,4961	0,3261	0,3426
A7-4	0,4856	0,3178	0,3456
A13-1	0,4301	0,3528	0,1798
A13-2	0,4605	0,2373	0,4848
B7-1	0,4601	0,3196	0,3054
B7-2	0,4033	0,2250	0,4421
B7-4	0,4879	0,2648	0,4573
B7-5	0,1547	0,0813	0,4742
H12-1	0,2901	0,0494	0,8297
H12-2	0,3418	0,1109	0,6755
H12-3	0,4667	0,2418	0,4818
H14-1	0,3856	0,2351	0,3903
H14-2	0,2248	0,1567	0,3028
H17-1	0,1110	0,0754	0,3209
H17-3	0,4899	0,2493	0,4911
H17-4	0,4987	0,1220	0,7554
UBC72-1	0,4419	0,1860	0,5792
UBC101-1	0,2823	0,2464	0,1271
UBC101-2	0,3934	0,1657	0,5787
UBC125-1	0,4238	0,2216	0,4771
Promedios	0,3059	0,1751	0,4276
Desv. Estándar	0,0323	0,0126	

1, Índice de diversidad genética total

2, Índice de diversidad genética dentro de las procedencias

3, Coeficiente de diferenciación genética

En el Cuadro 10 se presentan las estimaciones de diversidad genética según Nei (Nei 1978) y Shannon (Russell *et al*, 1993), para cada una de las procedencias. Los resultados muestran que mediante ambos métodos se obtienen resultados similares. La procedencia de Guatemala posee el índice de diversidad mayor y Panamá el menor.

Cuadro 10 Niveles de diversidad genética según Shannon y Nei. para las diferentes procedencias de caoba sujetas a estudio

Procedencias	Índice de diversidad de Shannon	Índice de diversidad de Nei
Guatemala	0,3701	0,2416
México	0,2766	0,1806
Nicaragua	0,2642	0,1749
Costa Rica (Central Norte)	0,2513	0,1714
Costa Rica (Pacífico seco)	0,1829	0,1190
Panamá	0,1043	0,0671

4.1.5. Análisis de varianza molecular

Las estimaciones de los componentes de varianza dentro y entre las procedencias se calcularon mediante el análisis de varianza molecular o AMOVA (Excoffier *et al*. 1992), estos resultados, reflejan que la varianza entre las procedencias es de un 41,07 % mientras que la varianza dentro de las procedencias es de un 58,93%, valores que son iguales a los encontrados mediante la partición del índice de diversidad de Shannon en los componentes dentro y entre procedencias y muy similares a los valores relativos para estos mismos componentes según los índices de diversidad de Nei (43 y 57 % respectivamente).

Mediante el análisis de varianza molecular es posible descomponer la variabilidad existente dentro de las procedencias con la finalidad de estimar la contribución de cada una de estas por separado. Los resultados de los niveles de diversidad para las procedencias encontrados mediante AMOVA, difieren de lo encontrado con las dos metodologías anteriores (Shannon y Nei), para el caso de la procedencia "Costa Rica Pacífico Seco", la cual según los resultados de AMOVA presenta el mismo nivel de diversidad genética que la

procedencia Guatemala (23,57), lo que las ubica como las procedencias de mas alto valor relativo de diversidad genética. El resto de las procedencias mantienen las mismas tendencias que presentan las otras metodologías (Cuadro 11).

Cuadro 11 Distribución de los componentes de varianza molecular

Varianza entre Procedencias	41,07 %
Varianza dentro de Procedencias	58,93 %
Descomposición de la varianza dentro de las Procedencias	
México	20,16 %
Guatemala	23,57 %
Nicaragua	15,96 %
Costa Rica (Central Norte)	11,41 %
Costa Rica (Pacífico Seco)	23,57 %
Panamá	5,32 %

4.1.6. Análisis discriminante canónico

Los resultados del análisis discriminante, reflejan un coeficiente de correlación mayor de 0,6 para las variables A7-1, A7-4, A13-2, B7-4, H12-2, H12-3, UBC101-1 y UBC101-2 como se puede ver en el Apéndice 5.

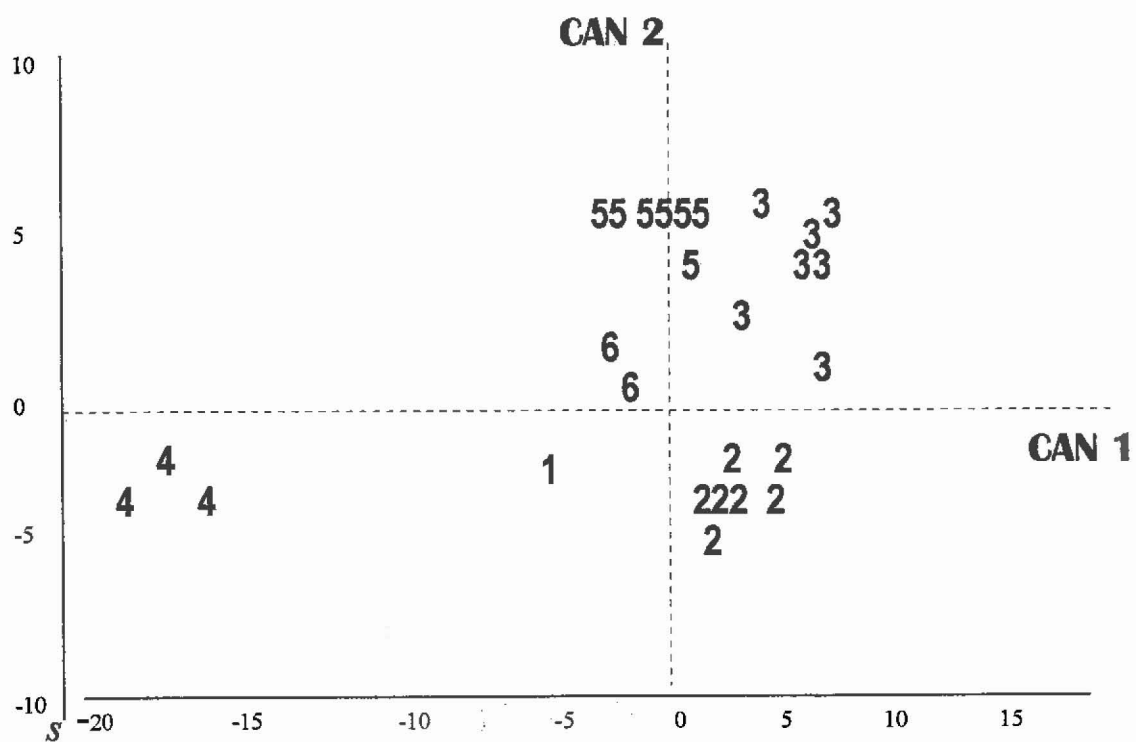
El análisis discriminante canónico aplicado a los resultados de las distancias genéticas, indica que el grupo canónico CAN 1 explica el 63 % de la variación total, mientras que CAN 2 explica el 21 %. Entre ambos grupos canónicos se obtiene una representación del 84 % de la variabilidad total encontrada para esta investigación.

La distribución gráfica de los grupos en función de las variables canónicas CAN1 y CAN 2, indica claramente una separación en dos grupos principales, el primero compuesto por las siete procedencias de Panamá más la familia 6-250, (cluster 4) y el segundo grupo compuesto por el resto de las procedencias centroamericanas. Dentro de este segundo grupo, los clusters más cercanos genéticamente son el 5 compuesto por las familias costaricenses 6-49, 6-87, 6-61, 6-143, 6-46, 6-73, 6-249, 6-122, 6-137 y 6-243, y el cluster 3, compuesto por una mezcla de familias de México, Guatemala, Nicaragua y Costa Rica. Dentro del grupo centroamericano, los clusters más distantes son el 5 (Costa Rica) y el 1, compuesto por dos familias guatemaltecas (3-131 y 3-151). La Figura 4 ilustra la distribución de los diferentes grupos en función de las variables canónicas CAN1 y CAN2, en el Apéndice 5 se encuentra la información referente a clasificación de las familias dentro de los grupos.

4.1.7. Dendograma

Mediante el programa MEGA (Kumar *et al*, 1993), se generó un dendograma (Figura 5), donde se pueden apreciar los patrones que exhiben las agrupaciones de las familias sometidas a estudio, en el mismo se demuestra la formación de dos grandes grupos diferentes en diversidad genética, uno formado por las familias de Panamá y el otro conformado por el resto de las familias centroamericanas. En este último caso, se aprecia la conformación de tres sub grupos; el primero de ellos formado por familias de México, Guatemala y Nicaragua más la familia 6-43 de la zona norte de Costa Rica, un segundo sub grupo conformado exclusivamente por familias de las dos procedencias de Costa Rica y un tercer sub grupo que lo forma la familia 1-14 de México, la cuál por su marcada separación se debe considerar como una familia con características especiales.

Para el caso del sub grupo conformado por familias de México, Guatemala y Nicaragua, se aprecia la existencia de seis nodos en donde el patrón de agrupamiento indica que las familias de las procedencias de México y Guatemala tienden a mantenerse juntas, situación que no comparten las familias de la procedencia de Nicaragua las cuales se



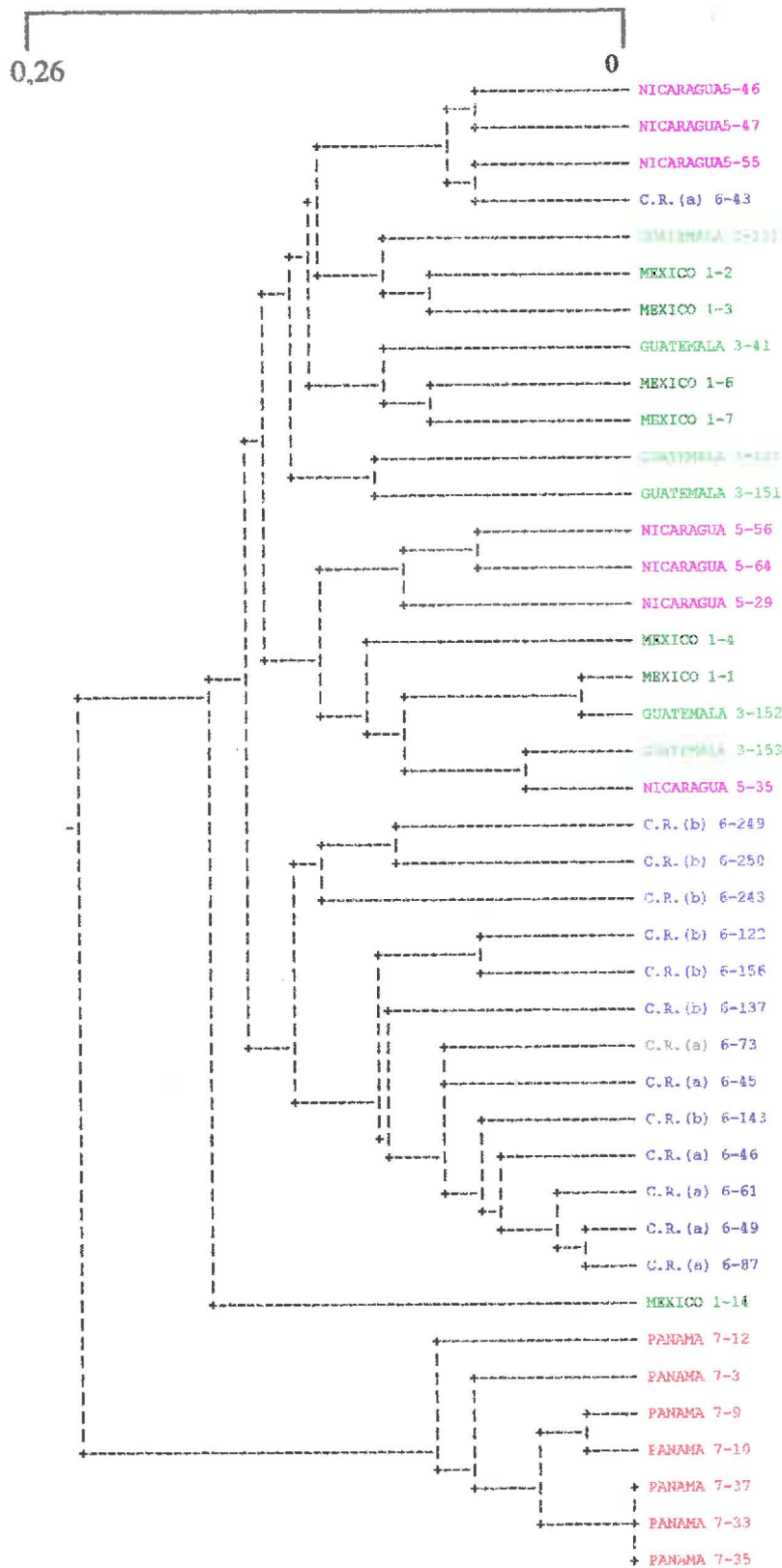


Figura 5. Dendrograma basado en el método UPGMA para 41 familias de caoba (*S. macrophylla*) de seis procedencias del área de Centroamérica y México. Mediante MEGA, (Kumar *et al*, 1993).

(a) = Zona central Norte
 (b) = Pacífico Seco

mantienen independientes de las mexicanas y guatemaltecas salvo el caso de la familia 5-35 de Nicaragua que aparece junto con la familia 3-153 de Guatemala.

4.1.8. Análisis "Bootstrap"

Por medio del análisis bootstrap, se estimaron los intervalos de confianza de los grupos y subgrupos que se formaron en el segundo dendograma. Los resultados de los muestreos reemplazatorios bootstrap indicaron que para el caso de los dos grupos principales en los que se divide el dendograma (Panamá y Centroamérica), existe una consistencia de 41 %. Dentro del grupo de Panamá los porcentajes de consistencia variaron entre el 15 y el 52 %. En el grupo centroamericano, se denota una menor consistencia, con porcentajes que van de 1 hasta 79 %. Los resultados del análisis bootstrap, aparecen en el Apéndice 6.

4.2. Ensayo cuantitativo

4.2.1. Resultados de las pruebas estadísticas

Los datos del ensayo cuantitativo fueron analizados con el paquete computacional SAS, arrojando la siguiente información:

4.2.2. Prueba de normalidad

Mediante el procedimiento de SAS Proc Univariate y la opción Plot Normal, se comprobó si los datos tenían una distribución normal dentro de cada una de las variables propuestas en la presente investigación. En la mencionada comprobación, efectivamente se encontró cuatro datos que se alejaron significativamente de sus promedios, debido a que este procedimiento detecta la ubicación exacta dentro de la base de datos (la fila y la columna). Se pudo comprobar así, que estos valores habían sido mal digitados en la base de datos.

4.2.3. Análisis de varianzas

Se analizaron los datos desde las mismas perspectivas que indican los objetivos, dentro y entre las procedencias. Se usó el Procedimiento GLM del programa SAS (SAS

Institute, 1988), indicando previamente en el paso "Data" las instrucciones para un análisis de varianza con las familias anidadas dentro de las procedencias.

Los resultados de los análisis de varianzas indicaron que para la variabilidad entre las procedencias (comparación de todas las familias entre sí), se encontraron diferencias altamente significativas ($Pr > F$ de 0,0001) para todas las variables, con la excepción de la variable "Relación Materia Seca Aérea / Materia Seca Raíz", la cual fué significativa sólo a nivel del 5 % de probabilidad ($Pr > F$ de 0,0238) (Apéndice 7).

En lo que respecta a la variabilidad genética dentro de las procedencias, también se encontró diferencias altamente significativas ($Pr > 0,0001$) dentro de ellas, para todas las variables con excepción también de la "Relación Materia Seca Aérea / Materia Seca Raíz" en donde no hubo significancia estadística entre las varianzas de las medias (Apéndice 7). Los promedios por procedencia para cada variable se puede apreciar en las Figuras 6 a la 11.

4.2.4. Comparaciones de medias

Debido a que se encontró significancia estadística entre los tratamientos (familias), se realizaron las comparaciones múltiples de las medias de los tratamientos mediante la prueba de Tukey. Los grupos Tukey, así como las comparaciones entre las procedencias para cada una de las variables se pueden apreciar con detalle en el Apéndice 7.

Para la variable altura las familias que mas sobresalieron fueron 3-101, 6-73, 7-10 y 7-37, con alturas que fluctuaron entre los 25,84 y los 24,9 cm, mientras que las que presentaron menor altura, fueron 7-33, 6-143 y 6-137 con alturas de 15,86, 15,62 y 13.53 cm. Respectivamente.

Las familias que mayor largo de raíz presentaron fueron: 1-6, 6-156, 6-137 y 6-243, con promedios entre los 33,58 y 30,58 cm, por el contrario los menores largos fueron de 24,78, 24,77 y 24,74 cm, para las familias 6-46, 6-43 y 7-37 respectivamente,

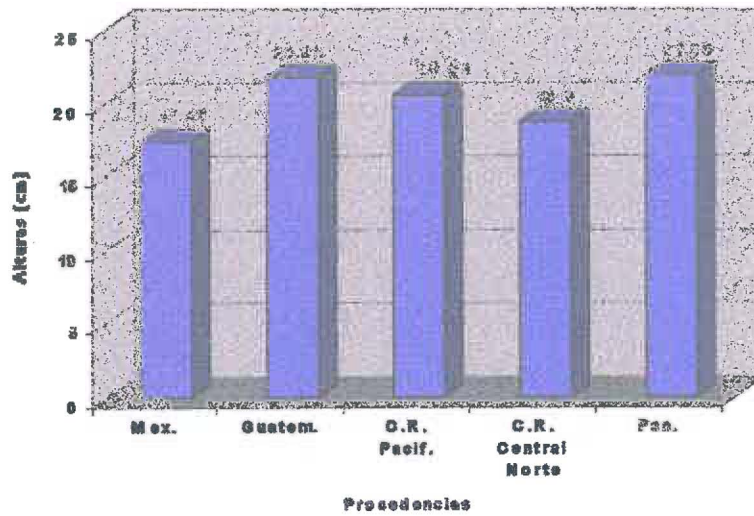


Figura 7. Alturas (cm) de las procedencias a los 106 días.

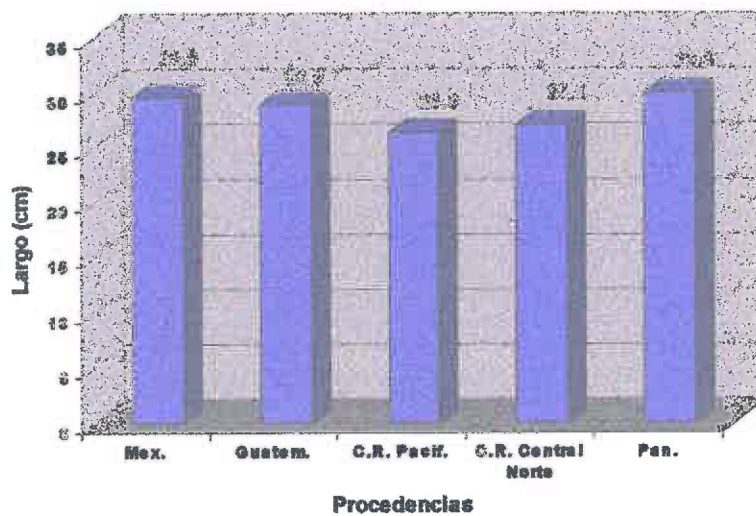


Figura 8. Largos de raíz (cm) de las procedencias a los 106 días.

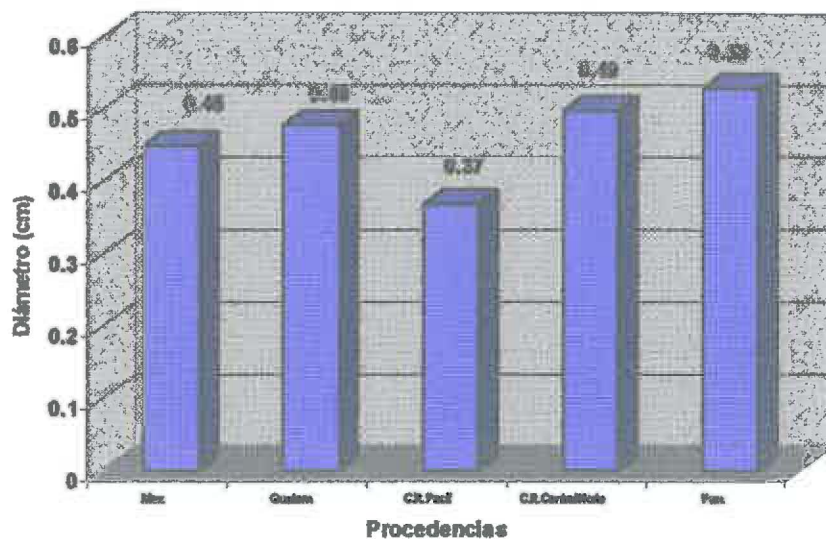


Figura 9. Diámetro del cuello del tallo (cm) de las procedencias a los 106 días.

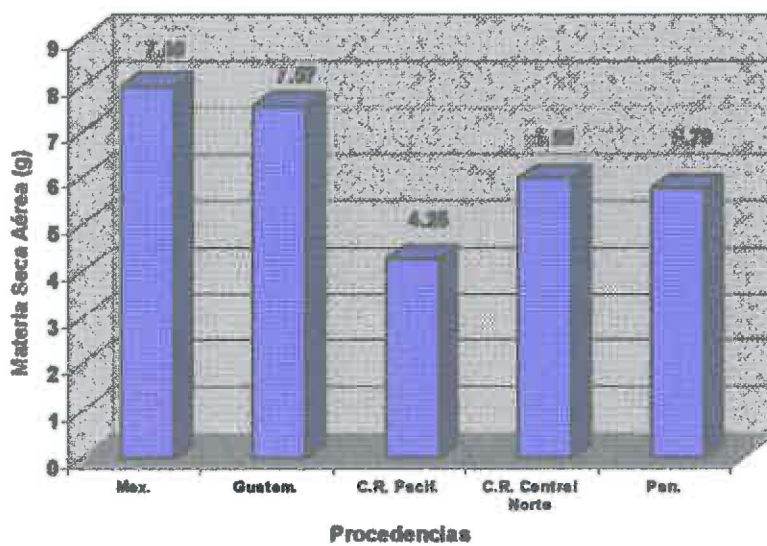


Figura 10. Rendimiento de materia seca de la parte aérea (g) de las procedencias a los 106 días.

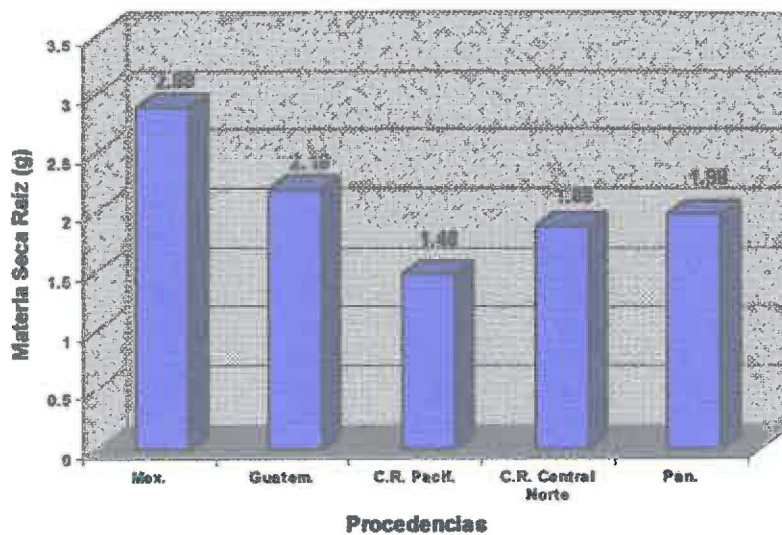


Figura 11. Rendimiento de materia seca de la raíz(g) de las procedencias a los 106 días.

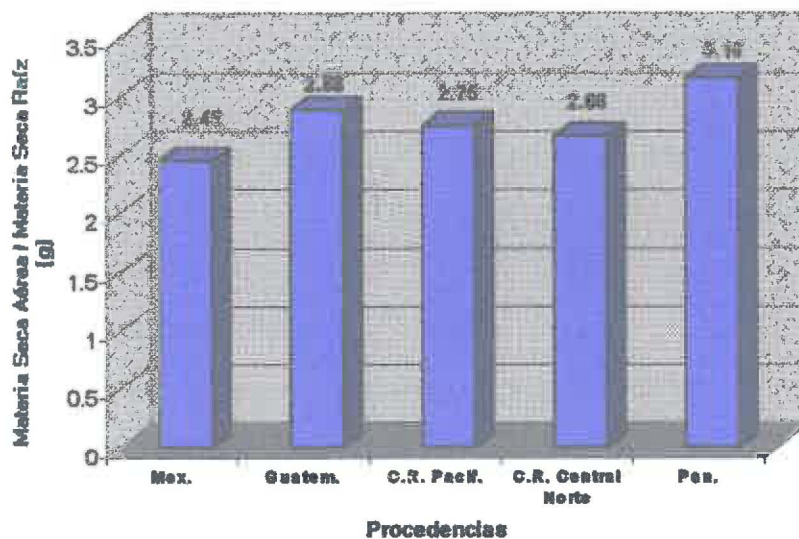


Figura 12. Rendimiento de materia seca parte aérea / rendimiento de materia seca de la raíz(g) de las procedencias a los 106 días.

Los mayores diámetros del cuello del tallo los obtuvieron las familias del Pacífico seco de Costa Rica: 6-156, 6-243 y 6-143 con fluctuaciones entre 0,53 y 0,64 cm. Mientras que las familias costarricenses de la Zona Central Norte: 6-46, 6-45 y 6-43, presentaron los diámetros más bajos registrando valores de entre 0,33 y 0,32 cm.

Los mejores promedios de rendimiento en cuanto a la materia seca aérea estuvieron entre los 10,47 y 8,22 g, correspondiéndoles a las familias 1-1, 3-101 y 1-5, mientras que los menores promedios (entre 3,17 a 2,45 g) corresponden a las familias 6-46, 6-43 y 6-45.

Los tres mayores rendimientos promedios de materia seca de la raíz fueron obtenidos por las familias mexicanas 1-1, 1-6 y 1-2, mientras que los más bajos rendimientos, fueron (como en el caso de la materia seca aérea), obtenidos por las familias 6-43, 6-46 y 6-45.

En cuanto a la relación de la materia seca aérea y la materia seca de la raíz, las familias con valores mayores para esta variable fueron 7-10, 6-122 y 6-46, contrastando con las familias 6-156, 6-243 y 1-2 las cuales presentaron los promedios menores.

Los resultados de las pruebas de Tukey, así como los gráficos de los valores promedios de las diferentes variables según procedencia, están en el apéndice 7

4.2.5. Heredabilidad

Se obtuvieron los valores de heredabilidad para los diferentes caracteres estimados mediante los valores de los cuadrados medios esperados y los cuadrados medios del error, con el procedimiento VARCOMP de SAS (SAS Institute, 1988). Estos coeficientes de heredabilidad dan un índice cuantitativo del grado de variación genética para cada una de las variables estudiadas, los valores de la heredabilidad expresan la proporción de la variación en la población que es atribuible a la diferencia genética entre individuos.

Se calcularon también los coeficientes de variación genética aditiva para cada una de las variables, de forma tal que se pudiera tener información que representara la cuota

porcentual de la variabilidad respecto a la media de cada variable. El Cuadro 12 recoge los valores de heredabilidad y los coeficientes de variación genética aditiva

Cuadro 12 Heredabilidades y coeficientes de variación genética aditiva de las familias de caoba evaluadas a nivel de vivero a los 106 días de edad. CATIE, 1998

Variable	Heredabilidad	Coefficiente de variación genética aditiva
Altura	0,21 +/- 0,01	0,29
Largo de raíz	0,05 +/- 0,01	0,14
Diámetro del cuello del tallo	0,16 +/- 0,01	0,28
Rendimiento de M.S. aérea	0,11 +/- 0,01	0,55
Rendimiento de M.S: raíz	0,18 +/- 0,01	0,64
Ms aérea / M.S raíz	0,02 +/- 0,01	0,30

5 DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo dejan de manifiesto que existen niveles significativos de diversidad genética dentro y entre las procedencias evaluadas tanto para las variables moleculares como para las determinaciones hechas a nivel de vivero. La metodología RAPDs, mostró ser una herramienta práctica y útil para estimar la diversidad genética, por otro lado, a pesar de que mediante el ensayo de variables cuantitativas realizado en vivero se logró identificar variabilidad genética, en el mismo no se pudo lograr la conformación de grupos o clusters sobre la base a las distancias genéticas como sucedió en el ensayo molecular, por razones que se explicarán mas adelante.

5.1. Estimación de la variabilidad genética molecular

Las estimaciones de los índices de diversidad y las representaciones gráficas acerca de las relaciones entre los materiales estudiados, fueron hechas de acuerdo a las bandas polimórficas encontradas en esta investigación las cuales fueron 28. De acuerdo a Nienhuis *et al*, (1995), con un número de 28 bandas polimórficas se obtiene un coeficiente de variación promedio de 23 % aproximadamente, el cual es bueno tomando en consideración las características de este trabajo, las cuales se describen más adelante.

La diversidad genética de las procedencias se evaluó a nivel molecular, siguiendo tres metodologías de análisis diferentes, i) el índice de diversidad genética de Nei (Nei, 1973), ii) el índice de diversidad de Shannon (Russell *et al*, 1993; Tazuka *et al*, 1998) y iii) el análisis de varianza molecular WINAMOVA (Excoffier *et al*, 1992; Lou *et al*, 1998), los cuales dieron resultados muy similares tanto dentro como entre las procedencias. Sin embargo, la versatilidad en la organización de los niveles jerárquicos al momento de analizar los datos moleculares (regiones, poblaciones, grupos de poblaciones, poblaciones dentro de regiones *etc*), que ofrece el análisis de varianza molecular, fue un factor importante en este estudio.

En los resultados encontrados se aprecia que la mayor parte de la variabilidad genética, se encuentra distribuida dentro de las procedencias, lo que concuerda con lo

expresado por Loveless y Hamrick (1987); Hamrick *et al* (1992), para la mayoría de las especies forestales de polinización abierta.

El índice de diversidad genética total de Nei, resultó ser moderadamente alto (0,31), de acuerdo con lo encontrado por Loveless y Hamrick (1987); Loveless (1992); Hamrick (1992), (0,27-0,32), lo que indica la presencia de varios alelos en algunos loci y una distribución equitativa de las frecuencias de los alelos en la mayoría de los loci.

Por otro lado, el índice de diferenciación genética (G_{st}) encontrado (0,41), indica que, de acuerdo a los resultados, el 41 %, de la variación total de las familias se debe a las diferencias existentes entre las procedencias. Se ha demostrado que los valores de G_{st} son significativamente diferentes en plantas de diferentes grupos taxonómicos, distribuciones regionales, sistemas de apareamiento y polinización, mecanismos de dispersión de semillas y sucesión de hábitats (Loveless y Hamrick; 1984 y 1987). En general, poblaciones de plantas altamente sub divididas presentan valores de G_{st} de 0,20 o mas, mientras que las extensas poblaciones continuas de pinos de zona templada tienden a valores de G_{st} de 0,05 o menos (Loveless, 1992). Por lo tanto, el alto valor de G_{st} que refleja este trabajo se puede deber a la influencia de las familias de Panamá, ya que las poblaciones panameñas no comparten las mismas áreas de distribución natural que han tenido las poblaciones mesoamericanas (Figura 13).

Se logró establecer que las procedencias con mayor diversidad genética son las de Guatemala y Costa Rica (Pacífico Seco), y la que menor diversidad refleja es la procedencia Panamá., el resto de ellas (México, Nicaragua y la zona norte de Costa Rica) no evidencian diferencias marcadas.

Las causas exactas de las diferencias en diversidad entre las procedencias y sobre todo en el caso de la procedencia de Panamá, no se pueden determinar con exactitud en el presente trabajo, sin embargo, algunas de las razones que determinan en gran medida la organización de la variabilidad genética dentro de las poblaciones y procedencias son: las

categorías de rangos geográficos, distribución regional, sistemas de fertilización y modos de reproducción, lo mismo que los mecanismos de dispersión de semillas (Bawa *et al*, 1987; Loveless 1992, Hamrick 1992).

Recogiendo el concepto anterior, se puede decir entonces que los factores que propician o impiden el flujo genético entre poblaciones pueden tener un efecto trascendental en los parámetros medidos para estas procedencias. En el caso particular de este estudio es muy probable que las diferencias en los niveles de diversidad encontrados sean el producto de la migración originada a partir de dos centros de origen diferentes, (Mesoamericano y Suramericano), el aislamiento geográfico, y de los procesos de fragmentación.

Las diferencias encontradas mediante los resultados de los índices de diversidad se aprecian con mayor claridad al estudiar el análisis UPGMA (dendograma) de las familias, en el cual se aprecia claramente la existencia de dos grupos marcadamente diferentes en diversidad genética, conformados uno por la procedencia Panamá, y el otro por una asociación del resto de las procedencias. Las familias panameñas tienen un patrón de agrupamiento muy compacto entre ellas, y a la vez distanciado de las familias de Centroamérica y México. Las diferencias encontradas en el caso de Panamá podrían deberse a una evolución diferente debido al aislamiento con el resto de las procedencias, o tal vez, a que la presencia de caoba en Panamá se debe a un patrón diferente de dispersión de esta especie, producto de la migración desde América del Sur. Estos supuestos se podrán confirmar realizando estudios similares incluyendo en los mismos materiales suramericanos.

El agrupamiento de las procedencias centroamericanas y mexicana, indica que entre ellas existe una estrecha relación genética la cual puede ser explicada como el producto de la distribución natural de la especie a través del istmo centroamericano en una dirección cardinal indeterminada pero efectivamente limitada a un área geográfica estrecha, no solo por aspectos geográficos sino que también por que dentro del área, las condiciones ambientales para la caoba son bastante homogéneas, por lo que la especie, a través de un largo período de evolución colonizó sitios similares en su proceso de expansión natural.

Las procedencias de Costa Rica son afines con las de Centroamérica pero presentan algunas particularidades que las hacen ser distintas a éstas. Las diferencias pueden deberse a que las poblaciones de Costa Rica corresponden a uno de los puntos extremos dentro del área de dispersión natural de la caoba en el área Mesoamericana, lo que haría que sus genotipos presentaran características diferentes debido tal vez a una adaptación ecotípica particular. Otra posibilidad podría ser que las poblaciones costarricenses compartan algunas características con las poblaciones de Panamá, lo cual de ser cierto les daría condiciones especiales. Lo anterior sería posible si se confirma que las procedencias de Panamá tienen relación estrecha con los materiales suramericanos ya que la mayor parte de Panamá estuvo unida a la masa continental suramericana antes de la emergencia del istmo centroamericano. Esta situación ya ha sido confirmada con otras especies vegetales y en el caso particular de especies forestales fue reportado por Chalmers *et al*, (1992) en un estudio de variabilidad genética de poblaciones de *Gliricidia sepium* y *G. maculata*. Una última posible explicación acerca de las particularidades de las procedencias costarricenses con respecto a las centroamericanas, es el aislamiento geográfico de sus poblaciones producto de los procesos de fragmentación de los bosques que originalmente mostraban poblaciones homogéneas, esto ha provocado la formación de poblaciones pequeñas y aisladas.

En términos generales, los grupos que se forman mediante los análisis UPGMA, tienen lógica si tomamos en consideración lo propuesto por Lamb (1966), sobre la distribución de *S. macrophylla*. De acuerdo a Lamb, y a lo actualizado por Wilson *et al* (1997) (Figura 13), la distribución de *S. macrophylla* se extiende de forma continua desde la costa Atlántica de México, hasta la región central norte de Costa Rica, (lo que en la actualidad se conoce como Mesoamérica), desde donde se fracciona para luego continuar desde la costa del Pacífico panameño hacia América del Sur.

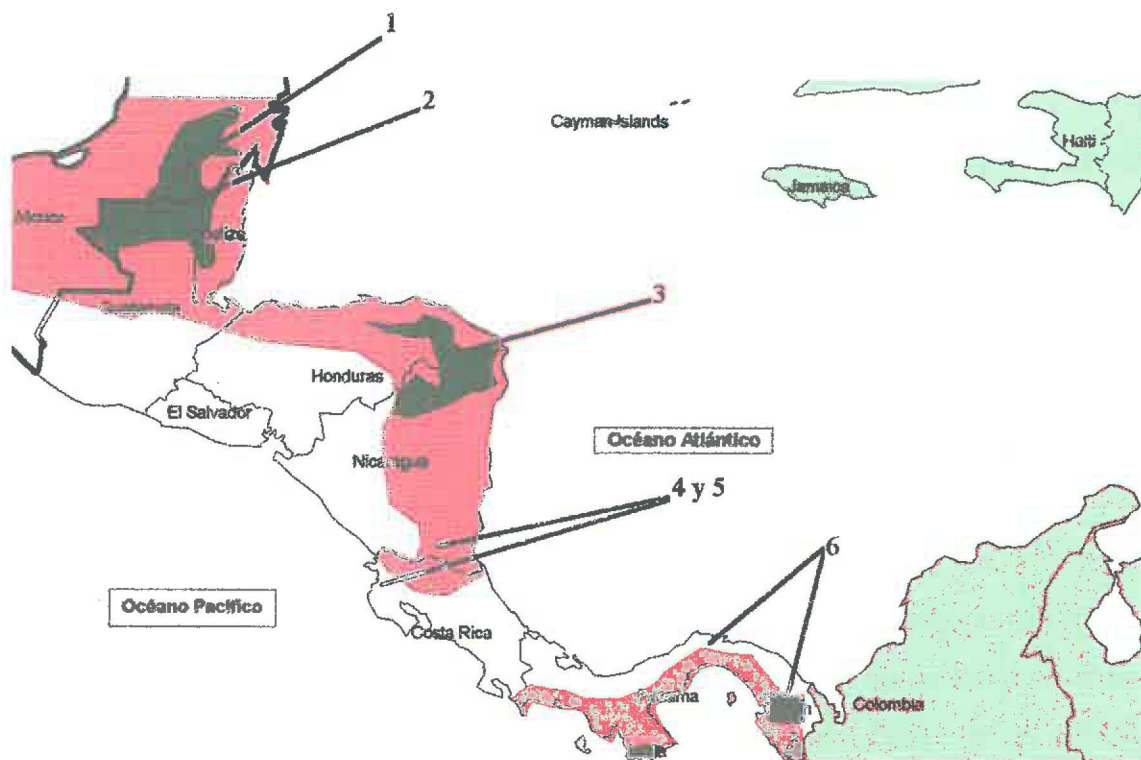
En el Figura 1, se ilustra por medio de un mapa la localización de los sitios de colecta de semillas y hojas de caoba realizados por el Proyecto "Determinación de la diversidad genética de especies arbóreas tropicales de importancia económica y ecológica en Centro América y el Caribe" Wilson *et al*, (1997). En el citado mapa se resalta la ubicación

de las procedencias utilizadas en este trabajo. Al comparar el mapa que describe la distribución de caoba en el área centroamericana de acuerdo a lo propuesto por Lamb en 1966 y en donde simultáneamente se ilustran los fragmentos existentes en la actualidad, (Figura 13), se puede ver que las procedencias de México, Guatemala y Nicaragua, provienen de áreas relativamente grandes que son reductos de lo que anteriormente fue una población continua, debido a esto es muy probable que estas procedencias estén compartiendo aún la mayoría de sus características genéticas, pues tal vez los efectos de la fragmentación no estén influyendo todavía en la diferenciación genética por ser estas fragmentaciones muy recientes.

5.1.1. Comparación entre los resultados de la variabilidad genética molecular y lo informado en un estudio previo llevado a cabo con los padres de esos materiales.

Uno de los objetivos de la presente investigación fue comparar los resultados obtenidos de una investigación anterior en la cual se analizó el ADN de las hojas de árboles maduros presentes en poblaciones de caoba existentes en el área centroamericana, con los resultados de este trabajo, en donde se sembraron semillas de algunos materiales con el fin de hacer un estudio de las descendencias, para comprobar de esta manera si el efecto de la fragmentación forestal en el área ha tenido alguna consecuencia en la diversidad genética de las poblaciones de caoba del área centroamericana. Para cumplir con este objetivo, a continuación se dan algunos detalles sobre ambas investigaciones y se procede a discutir los resultados encontrados para establecer si ciertamente la fragmentación forestal está teniendo un efecto en las poblaciones de caoba coincidentes en ambos trabajos.

En el área de Mesoamérica, el CATIE en colaboración con el ITE de Escocia estudió la variabilidad genética de *S. macrophylla* para lo cual se analizó usando RAPDs, el ADN obtenido de hojas colectadas *in situ*. En dichas colectas también se obtuvo semillas que son la base del presente estudio, pues se consideró que era importante determinar si la fragmentación forestal ha tenido algún tipo de efecto sobre las siguientes generaciones de



1. México (Quintana Roo)
2. Guatemala (Tikal)
3. Nicaragua (Bonanza)
4. Costa Rica Zona Central Norte (Los Chiles)
5. Costa Rica Pacífico Seco (Sardinal, Santa Rosa)
6. Panamá (Quintín, Gatún, Paraíso)

Figura 13 Distribución natural de *S. macrophylla* en el área mesoamericana de acuerdo con Lamb (1966) y la situación actual según Navarro 1997. (Tomado de Wilson *et al*, 1997).

* Las áreas en rosado corresponden a la distribución según Lamb.

* Las áreas en verde oscuro corresponden a la situación actual según Navarro.

los árboles de caoba en el recién fragmentado bosque húmedo centroamericano (Wilson, *et al*, 1997).

Hay que tener presente que si bien es posible hacer algunas comparaciones entre ambos trabajos, el estudio de los padres abarcó un número mayor de familias (433) que el presente estudio de descendencias, y se incluyó las poblaciones de Belice y Honduras, no consideradas en la presente investigación por no contarse con suficientes semillas.

En este estudio de las descendencias se incluyeron familias del área central norte y del Pacífico seco de Costa Rica para comprobar si entre ambas existían diferencias en variabilidad como se encontró en el caso de *Cedrela odorata* L., en el estudio realizado por Gillies *et al*, (1997). A pesar de que ambas especies pertenecen a la misma familia botánica (Meliáceas), para caoba no se encontró diferencias en variabilidad genética entre las procedencias del Pacífico seco y la zona central norte del país.

Al comparar los resultados obtenidos en la presente investigación con los informados por Wilson *et al*, (1997), se demostró en ambos trabajos, la existencia de mayor diversidad genética dentro de las poblaciones o procedencias que entre ellas. Sin embargo en el estudio de los padres, se nota que la magnitud de la variabilidad genética dentro de las poblaciones fue sumamente alta (88,56 %), mientras que entre poblaciones fue bajo (9,5 %), lo que es normal para poblaciones continuas en estado de equilibrio genético. Se debe resaltar el hecho que, aunque las poblaciones muestreadas se encuentran en la actualidad dentro de fragmentos de diferentes tamaños, los individuos incluidos en ellas representan lo que anteriormente fue un área continua de distribución de la especie. Por eso es de esperarse que la diversidad genética estimada a partir de las hojas de árboles adultos mantenga características de una población continua en equilibrio.

En el caso de esta investigación los porcentajes de variación dentro y entre las procedencias fueron altos (58,93 y 41,01 respectivamente), lo mismo que el índice de

diferenciación genética (0,43), lo que es característico de poblaciones que mantienen algún grado de aislamiento entre ellas.

Al comparar un poco mas en detalle los dos estudios, se observa que hay coincidencias en los resultados encontrados para Guatemala pues en ambos estudios, estas procedencias tuvieron el mayor índice de diversidad genética. Para el caso de Panamá se da una situación diferente pues en el estudio de los padres esta reflejó el mismo nivel de diversidad que Guatemala, en el presente estudio, la procedencia de Panamá dio el menor índice de diversidad.

Las divergencias entre ambos estudios deben considerarse a partir de las diferencias metodológicas y conceptuales de ambas investigaciones. La primera de ellas es que en el estudio de Wilson y colaboradores (1997), el cual tuvo una duración aproximada de dos años y medio, se trabajó a partir de muestras de hojas de 433 árboles adultos maduros reproductivamente, los cuales representaron 41 poblaciones naturales de 7 países centroamericanos. La segunda diferencia en el número de marcadores polimórficos RAPDs con los cuales desarrollaron la investigación, siendo éstos 102.

El presente trabajo, se conceptualizó como un estudio inicial de las progenies de algunas de las familias evaluadas en el trabajo de Wilson y colaboradores, con la intención de determinar la tendencia de la variabilidad en la siguiente generación. Para el estudio de las progenies se uso semilla de 41 familias, mismas que representaron seis procedencias del área de Centroamérica y México. Las diferencias metodológicas se debieron principalmente a los recursos en tiempo y dinero con que se contó para este trabajo, en el cual se generaron 28 bandas polimórficas.

Aparte de las diferencias encontradas entre ambos estudios con respecto a la procedencia Panamá, notamos que con el resto de las procedencias estudiadas no se aprecian grandes divergencias en los niveles de diversidad genética.

Wilson *et al.*, (1997), comparan los bajos niveles de diversidad genética de caoba (*S. macrophylla*) en poblaciones de Belice, debido a su historia de explotación maderera, contrastando con las poblaciones vírgenes existentes en Guatemala en donde encontraron niveles altos de diversidad. Para la población de Quintín en Panamá, la cual reflejó valores similares de diversidad con la de Tikal y La Técnica en Guatemala, explican que corresponde a un fragmento de bosque virgen rodeado por áreas de destrucción forestal, recomendando que se dicten normas de protección antes de que sea destruída totalmente y se pierda su diversidad genética, la cual es comparable a las poblaciones de Guatemala.

El señalamiento anterior de Wilson *et al.*, (1997), puede ser parte de la explicación sobre la diferencia de los resultados de ambos trabajos, la representación que se tiene de la diversidad de la procedencia de Panamá es un reflejo de la situación actual del flujo genético existente en un fragmento reducido de bosque virgen que hace varios años presentaba un tamaño de población mayor. Esto puede ser una clara explicación del efecto de la fragmentación forestal sobre la diversidad genética de una población debido a la explotación descontrolada del recurso *S. macrophylla*. Las poblaciones pequeñas son frecuentemente susceptibles a la pérdida de sus alelos por deriva genética. Además, la reducción del tamaño de las poblaciones también tiene consecuencias peligrosas debido a que pueden comenzar a darse en ellas procesos de introgresión, o reducción de los promedios alélicos causados por el incremento en la homocigosidad y el enmascaramiento de genes recesivos deletéreos. Por esto la estimación de la variabilidad genética es una parte importante en el manejo de especies en peligro de extinción (Storfer, 1996).

5.2. Comparación de la variabilidad genética en el ámbito cuantitativo y molecular

De acuerdo a Storfer (1996), la estimación de la variación producida mediante los ensayos de caracteres genéticos cuantitativos, provee información valiosa para las decisiones en materia de conservación. Los rasgos cuantitativos, morfológicos y de comportamiento son de importancia ecológica debido a que ellos a menudo están directamente relacionados con la sobrevivencia. Además la evolución adaptativa usualmente es el resultado de cambios en los rasgos cuantitativos. Las estimaciones de la heredabilidad son un indicador de la

oportunidad de respuesta a la selección, y por ende del potencial evolutivo de las poblaciones

Llevar a cabo un estudio de la variabilidad genética de las procedencias mediante ensayos cuantitativos, requiere el control de una serie de factores que pueden afectar sensiblemente los resultados del mismo. Es importante que se sepan diagnosticar con tiempo todas las fuentes de variación externa a la que los materiales puedan estar expuestos para lograr tener estimaciones precisas sobre la variación genética a nivel de vivero. Por otro lado en los ensayos basados en marcadores moleculares de ADN, si bien es cierto de que se requiere estandarizar las condiciones para la conducción del mismo y lograr claridad y repetitividad en los resultados, cuanto esto se logra, el mismo se transforma en una herramienta sumamente poderosa para explorar segmentos de ADN codificante y no codificante, los cuales en la mayoría de los casos expresan suficiente información de la variabilidad genética para poder organizar los individuos estudiados en grupos basados en sus relaciones de similitud o diferencia.

Los resultados obtenidos en el ensayo cuantitativo mediante el modelo de efectos aleatorios (familias anidadas dentro de las procedencias) reflejaron la existencia de diferencias significativas dentro de las procedencias, lo que se traduce en que efectivamente la variabilidad dentro de las procedencias es alta en todos los casos. Si bien es cierto que este resultado es coincidente con lo encontrado en el ensayo molecular, las pocas variables que se obtienen en la etapa de vivero no permitieron detectar un patrón de diferencias consistente entre las procedencias mediante pruebas estadísticas (contrastes ortogonales y/o prueba de Dunnett).

De la misma manera que se hizo en el ensayo molecular, en el de vivero, se realizaron las comparaciones entre las familias evaluadas (modelo de efectos fijos) llegándose a conformar grupos sobre la base de la similaridad expresada mediante los promedios de cada variable cuantitativa (Apéndice 7). Los grupos formados proveen información importante sobre la variabilidad genética existente lo cual tiene aplicación en el

área de mejoramiento genético forestal, al poder a través de estos grupos identificar a las mejores familias para cada característica evaluada, igualmente se pueden plantear las decisiones en materia de conservación del recurso.

Sin embargo los grupos formados en el ensayo cuantitativo (por ser meramente descriptivos), no aportaron información coherente para formular apreciaciones sobre relaciones evolutivas, como tampoco sobre los índices relativos de diversidad existentes dentro de las procedencias, como sí se logro mediante el ensayo molecular, ya que estos grupos son meramente descriptivos.

La mejor forma de estimar el valor de la variabilidad en los ensayos cuantitativos es por medio de la heredabilidad. La heredabilidad de las variables altura y diámetro del cuello del tallo presentaron índices altos, lo mismo que en el caso de los rendimientos de materia seca tanto de la parte aérea como de la raíz, sin embargo estos últimos presentaron coeficientes de variación genética aditiva altos. La variable "Largo de raíz" demostró una heredabilidad relativamente baja, posiblemente esta variable se vio mayormente afectada por los efectos ambientales, debido a que entre los meses de diciembre de 1997 y enero de 1998, el régimen de lluvias disminuyó drásticamente y aunque se realizaron riegos complementarios, estos quizás no fueron suficientes.

Otra variable que obtuvo un valor bajo de heredabilidad fue la relación "rendimiento de materia seca aérea / rendimiento de materia seca de raíz". Evaluando los resultados de los coeficientes de variación genética aditiva, para los rendimientos de materia seca, se nota que los mismos son relativamente altos. Esto sugiere que no existió uniformidad en el proceso de secado, debido posiblemente a las diferencias en la eficiencia entre los dos hornos utilizados.

De acuerdo con los resultados en el ensayo cuantitativo las heredabilidades encontradas para la mayoría de las variables fueron de bajas a moderadas, y con bajos errores estándares. Sin embargo, los coeficientes de variación genética aditiva fueron por el

contrario de moderados a altos. Las variables que resultaron con índices de heredabilidad y coeficientes de variación genética aditiva aceptables fueron únicamente las variables altura y diámetro del cuello del tallo. Las demás hay que considerarlas con cuidado.

6. CONCLUSIONES

1. La metodología RAPD permitió determinar los polimorfismos de ADN necesarios para poder estimar mediante tres metodologías diferentes, los índices de diversidad genética presentes dentro y entre las procedencias de caoba (*S. macophylla*) utilizadas en esta investigación.
2. La determinación de los índices de diversidad genética puede realizarse mediante cualquiera de las tres metodologías empleadas en esta investigación pues se obtienen resultados similares, sin embargo la más flexible en lo referente a la organización jerárquica de los datos es el Análisis de Varianza Molecular.
3. Los índices de diversidad genética fueron altos lo que indica que una gran proporción del total de la variación es compartida entre las procedencias evaluadas.
4. El índice de diferenciación genética (G_{st}), demostró que el 41 % de la variación total encontrada en este trabajo se debe a las diferencias existentes entre las procedencias, lo que es característico de poblaciones que mantienen algún grado de aislamiento entre ellas.
5. La partición de la diversidad genética presente dentro de las procedencias, demostró que la procedencia con mayor diversidad genética fue la de Guatemala mientras la menor diversidad genética la obtuvo la de Panamá.
6. Tanto el análisis discriminante canónico, como el dendograma de distancias genéticas generados demostraron de forma clara que las procedencias estudiadas se separan en dos grupos básicos compuestos uno por las familias de la procedencia Panamá y el otro por el resto de las procedencias mesoamericanas.

7. Dentro del segundo grupo compuesto por las familias centroamericanas y mexicanas, ocurre una sub división en donde se forma un primer sub grupo compuesto netamente por las familias de las procedencias de Costa Rica, un segundo sub grupo formado por una asociación de las familias mexicanas, guatemaltecas, nicaraguenses más la familia 6-43 de la zona central norte de Costa Rica, un tercer sub grupo donde se ubica únicamente la familia 1-4 de México, pero con intervalo de confianza bajo.
8. La conformación de las diferentes familias mesoamericanas dentro de los grupos está de acuerdo a un patrón lógico de dispersión de la especie en el istmo centroamericano, de acuerdo a lo propuesto por Lamb, (1966).
9. La separación de la procedencia Panamá del resto, sugiere que la misma ha sufrido una evolución diferente debido a su aislamiento con respecto a las procedencias mesoamericanas y / o que el origen de las familias panameñas es diferente al resto, pudiendo ser tal vez, de origen Suramericano.
10. La comparación de los resultados de esta investigación con los obtenidos en el estudio de los padres de las familias evaluadas sugiere que en el caso de las procedencias de Costa Rica y la de Panamá, el efecto de la fragmentación forestal está influyendo en la diversidad genética de las mismas.
11. Se demostró mediante la comparación de ambos estudios que no existen diferencias de diversidad entre los padres y las descendencias para las procedencias de México, Guatemala y Nicaragua. Lo anterior demuestra que los fragmentos forestales en donde se colectaron las semillas, aún son lo suficientemente grandes como para mantener la variabilidad genética existente antes de los procesos de fragmentación.
12. El estudio cuantitativo demostró la existencia de una alta variabilidad genética dentro y entre las procedencias evaluadas.

13. Los mejores índices de heredabilidad encontrados en el estudio cuantitativo se dieron para las variables altura, diámetro del cuello del tallo, rendimiento de materia seca aérea y rendimiento de materia seca de la raíz, sin embargo para estas dos últimas variables los coeficientes de variación genética aditiva fueron altos para el caso de esta investigación en particular.
14. Se pudo determinar mediante el estudio cuantitativo cuales fueron las familias que mejores promedios de rendimiento tienen para cada una de las variables cuantitativas evaluadas.
15. No fue posible realizar inferencias sobre aspectos evolutivos entre las familias estudiadas sobre la base a los grupos formados mediante los promedios de las variables cuantitativas.

7. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios similares con la inclusión de un mayor número de marcadores y un mayor número de familias por población para obtener estimaciones más precisas sobre la diversidad genética de estas procedencias.
2. Estudiar con mayor cuidado las particularidades que presenta la procedencia Panamá en cuanto a diversidad genética. Para esto, sería recomendable realizar otro estudio incluyendo además de las procedencias utilizadas en el presente trabajo, procedencias Suramericanas.
3. Planificar el diseño de estrategias de manejo sostenible en las poblaciones de Quintana Roo (México) y Bonanza (Nicaragua) para salvaguardar la diversidad genética existente del recurso caoba debido a que de acuerdo con los resultados de este trabajo, las mismas conservan aún la variabilidad genética existente en el área de distribución geográfica de caoba antes de que las misma sufriese los procesos de fragmentación. Para el caso de Tikal en Guatemala, existen referencias de que ya se están llevando a cabo prácticas de conservación del recurso genético caoba.
4. Diseñar un programa de conservación y recuperación en las poblaciones afectadas por la tala indiscriminada en la provincia del Darién en Panamá, ya que se ha demostrado la pérdida de variabilidad genética en poblaciones como Quintín.
5. Iniciar estudios sobre mecanismos y patrones de polinización, biología reproductiva y mecanismos de dispersión de semillas en las poblaciones de caoba estudiadas recientemente para lograr determinar con mayor precisión los factores relacionados con la variabilidad genética existente en las mismas.

8. BIBLIOGRAFÍA

- ALVARENGA, S.; FLORES, E.M. 1988 Morfología y germinación de la semilla de caoba, *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae). *Revista Biología Tropical* 36(2A): 261-267.
- BAWA, K.S.; O'MALLEY, D.M. 1987. Estudios genéticos y de sistemas de cruzamiento en algunas especies arbóreas de bosques tropicales. *Revista Biología Tropical*. Supl. 1: 177-188.
- CHALMERS, K.J.; NEWTON, A.C.; WAUGH, R.; WILSON, J.; POWELL, W. 1994. Evaluation of the extent of genetic variation in mahoganies (Meliaceae) using RAPD markers. *Theoretical Applied Genetics* 89: 504-508.
- CHALMERS, K.J., WAUGH, R., SPRENT, J.I., SIMONS, A.J., POWELL, W. 1992. Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. Maculata* using RAPD markers. *Heredity* 69: 465-472.
- CORNELIUS, J. 1995. La variación genética. *In* Manual sobre mejoramiento genético forestal, con referencia especial en América Central. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica.
- DE BUSTOS, A., CASANOVA, C., SLER, C., JUVE, N. 1998. RAPD variation in wild populations of four species of the genus *Horedum* (Poaceae). *Theoretical and Applied Gentic*s 96: 101-111.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- FUERMAN, B.J.; GRATTAPAGLIA, D.; DVORAK, W.S.; O'MALLEY, D.M. 1997. Analysis of genetic relationships of central american and mexican pines using RAPD markers that distinguish species. *Molecular Ecology* 6: 321-331.
- GILLIES, A. C. M.; CORNELIUS, J. P.; NEWTON, A. C.; NAVARRO, C.; HERNÁNDEZ, M.; WILSON, J. 1997. Genetic variation in Costa Rican populations of the tropical timber species *Cedrela odorata* L. Assessed using RAPDs. *Molecular Ecology* 6: 113-1145.

- GUEILFUS, F. 1994. El árbol al servicio del agricultor. Manual de agroforestería para el desarrollo rural. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 414-415 pp.
- HAINES, R.J. 1994. El papel de la biotecnología en el mejoramiento de las especies forestales con referencia a los países en desarrollo. Resumen. FAO, MONTES 18p.
- HAINES, R.J.; MARTIN, B.E. 1995. Biotechnology and sustainable production of tropical timber. International tropical timber organization. Australia 168p.
- HAMRICK, J.L. 1992. Distribution of variation in tropical tree populations: implications for the conservation of genetic resources. Paper to IUFRO S2. 02-08. Conference, Breeding Tropicals Trees, Cali, Colombia.
- HAMRICK, J. L.; GODT, W.; M.J., SHERMAN-BROYLES, S.,L.. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forest* 6: 95-124.
- HOWARD, F.; NAKAHARA, S.; WILLIAM, D.S. 1995. Thysanoptera as apparent pollinators of west Indies Mahogany *Swietenia mahogay* (Meliaceae). *Annales des Sciences Forestières*. 52 (3): 283-286.
- KEIDING, H. 1991. La conservación genética y el mejoramiento forestal. *In* Mejoramiento forestal y conservación de los recursos genéticos forestales tomo I.I 1995 DANIDA-CATIE. Turrialba, Costa Rica. 85-102.pp.
- KEIDING, H.; GRAUDAL, L. 1989. Mejoramiento forestal a nivel de especies y procedencias. *In* Mejoramiento forestal y conservación de los recursos genéticos forestales tomo I.I 1995 DANIDA-CATIE. Turrialba, Costa Rica. 69-84.pp.
- KEMP, R.H. 1993. Conservation of genetic resources in tropical forest management. Principles and concepts. FAO Forestry Paper N° 107. 130p.
- KUMAR, S.M.; TAMURA, K.; NEI, M. 1993. MEGA: Molecular evolution genetics analysis, version 1,0. The Pennsylvania State University, University Park, PA 16802.
- LAMB, F.B. 1966. Mahogany of tropical america. Its ecology and management. University of Michigan. Michigan. 219p.
- LEAKEY, R.R.B.; NEWTON, A.C. 1994. Domestication of tropical trees for timber and non timber products. *Mab digest* 17. 94p.
- LEE, H., Y. 1967. Studies in *swietenia* (Meliaceae): observations on the sexuality of the flowers. *Journal of the Arnold Arboretum* 48: 101-104.
- LITTLE, E.L. 1967. Arboles comunes de Puerto Rico y las Islas Vírgenes. Puerto Rico, Editorial Universitaria de Puerto rico. 359-364 pp.

- LOU, K. F.; WEISS, M. J.; BRUCKNER, P. L.; MORRILL, W. L.; TALBERT, L. E.; MARTIN, J. M. 1998. RAPD Variation within and among geographic populations of wheat stem sawfly (*Cephus cinctus* Norton). *The Journal of Heredity* 89 (4): 329-335.
- LOVELESS, M. D. 1992. Isozyme variation in tropical trees: patterns of genetic organization. *New Forest* 6: 67-94.
- LOVELEES, M. D.; HAMRICK, J.L. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annales Review of Ecology Systems* 15: 65-95.
- LOVELEES, M. D.; HAMRICK, J.L. 1987. Distribución de la variación en especies de árboles tropicales. *Revista Biología Tropical* 35 (Supl. 1): 165-175.
- MARINI, D.; VEGA, I.; MAGGIONI, L. 1993. *Genética agraria*. Universidad Nacional Agraria. Managua, Nicaragua. 350p.
- MARTINEZ, O. 1995. Métodos estadísticos multivariados en biología molecular y su aplicación en la investigación agrícola. *Agronomía colombiana* vol XII (1): 66-71.
- MESÉN, F. 1995. Selección de especies y procedencias forestales *In*. Manual sobre mejoramiento genético forestal, con referencia especial en América Central. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica.
- NAMKOONG, N. 1986. Genetics and the forests of the future. *Unasyuva*. 152. vol. 38 12-19.
- NEI, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. sci.* 70 : 3321-3323.
- NEI, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. 89: 583-590.
- NEWTON, A.C.; LEAKEY, R.R.B.; POWELL, W.; CHALMERS, K.; WAUGH, R.; TCHOUNDJEU, Z.; MATHIAS, P.J.; ALDERSON, P.G.; MESÉN, J.F.; BAKER, P.; Y RAMNARINE, S. 1997. Domestication of mahoganies. *Molecular ecology*. *In press*. 25p.
- NIENHUIS, J.; TIVANG, J. AND SKROCH, P. 1995. Genetic relationships among cultivars and landraces of Lima Bean (*Phaseolus lunatus* L.) as measured by RAPD markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. Vol. 120 (2): 300-306 pp.
- PAPAGEOURGIU, A.C. 1997. Application of gene markers in tree improvement programmes. *IUFRO*. Summer 1997 5-11 pp.

- PATIÑO, F. 1997. Recursos genéticos de *Swietenia* y *Cedrela* en los neotrópicos: propuestas para acciones coordinadas. Dirección de recursos forestales. Departamento de montes. FAO. Roma, Italia. 58p.
- PEDERSEN, A.P.; OLSEN, K.; GRAUDAL, L. 1993. Mejoramiento forestal a nivel de especies y procedencias. *In* Mejoramiento forestal y conservación de los recursos genéticos forestales tomo I. 1995 DANIDA-CATIE. Turrialba, Costa Rica. 57-74. pp.
- PENNINGTON, T.D.; SARUKHAN, J. 1968. Árboles tropicales de México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales. México21, D.F. México 413p.
- PHILLIPS, W.; RODRIGUEZ, H.; FRITZ, J. P. 1995. Marcadores de ADN: teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo. Serie Técnica. Informe Técnico / CATIE no. 252. 183p.
- RUSSELL, J.R.; HOSEIN, F.; JOHNSON, E.; WAUGH, R.; POWELL, W. 1993. Genetic differentiation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) populations revealed by RAPD analysis. *Molecular Ecology* 2: 89-97.
- SAITOU, N.; NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and evolution* 4: 406-425.
- SALAZAR, L. C. 1987. Manual práctico para el manejo de experimentos agrícolas y pecuarios. Facultad de Agronomía, Universidad de Panamá. 146p.
- SAS INSTITUTE. 1988. Sas/stat user's guide, release 6.03 edition. Cary, NC: SAS Institute Inc., 1028p.
- STANDLEY, P. 1946. Flora of Guatemala. Chicago Natural History Museum v. 24, part 5, 458-459pp.
- STORFER, A. 1996. Quantitative genetics: a promising approach for the assesement of genetic variation of endangered species. *Tree*. vol 11. no 8: 343-347
- STYLES, B.T. 1972. The flower biology of the Meliaceae and its bearing on tree breeding. *Silvae Genetica* 21 (5): 175-182.
- TOZUKA, A.; FUKUSHI, H.; HIRATA, T.; OHARA, M.; KANAZAWA, A.; MIKAMI, T.; ABE, J.; SHIMAMOTO, Y. 1998. Composite and clinal distribution on *Glycine soja* in Japan revealed by RFLP analysis of mitochondrial DNA. *Theoretical Applied Genetics* 96 : 170-176.

- VIRK, P. S.; FORD-LLOYD, B. V.; JACKSON, M. T.; NEWBURY, H. J. 1995. Use of RAPD for the study of diversity within plant germplasm collections. *Heridity* 74: 170-179.
- WELSH, J.; McCLELLAND, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nuclei Acids Research* 18: 7213-7218.
- WEISING, K.; NYBOM, H.; WOLF, K.; MEYER, W. 1995. DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press Inc. Boca ratón, Florida.
- 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 genetics markers. *Nuclei Acids Research* 18: 6531-6535.
- WILSON, J.; GILLIES, A.C.M.; NEWTON, A.C.; CORNELIUS, J.P.; NAVARRO, C.; HERNANDEZ, M.; KREMER, A.; LABBE, P.; CARON, H. 1997. Assessment of genetic diversity of economically and ecologically important tropical tree species of Central America and the Caribbean: implications for conservation, sustainable utilization and management. Final scientific report. Bush Estate, Penicuik, Midlothian, U.K: 111p.
- WINOGRAD, M. 1995. Indicadores ambientales para Latinoamérica y el Caribe: hacia la sustentabilidad en el uso de tierras. San José, Costa Rica, Proyecto IICA/GTZ, OEA, WRI. 85p.
- WRIGHT, J.W. 1976 Introduction to forest genetics. Academic Press, Inc. New York. 463p.
- YEH, F. C.; YANG, R.; BOYLE, T. 1997. Popgene version 1,21. Microsoft window-based freeware for population genetic analysis. A joint proyect development by Francis C. Yeh and Rong-Cai Yang, University of Alberta and Tim Boyle, Centre for International Forestry research.
- ZOBEL, B.; TALBERT, J. 1992. Técnicas de mejoramiento genético de árboles forestales. Ed. Limusa. C.V. México. Grupo Noriega Editores. 545p.

9. APÉNDICE

Apéndice 1

Protocolo de extracción CTAB-Minipreparaciones

1. Macere muy bien 0,2 g en un mortero con nitrógeno líquido. Coloque el polvo en un Eppendorf de 1,5 ml y agregue 100 µl de buffer 2X CTAB. Macere fuertemente con un pistilo
2. Adicione 900 µl de buffer y luego 2 µl de mercaptoetanol (en la cámara de gases). Cierre la tapa, agite con el vortex hasta uniformizar.
3. Incube en Baño María a 65°C por 30 minutos. deje enfriar por 4 minutos.
4. Adicione 400 µl de una solución 24:1 de cloroformo-isoamyl alcohol a temperatura ambiente (cámara de gases) y mezcle fuertemente con el vortex. Microcentrifuge a 13.000 r.p.m. por 5 minutos
5. Transfiera cuidadosamente el sobrenadante a un tubo limpio y repita el paso anterior.
6. Transfiera el sobre nadante a un tubo limpio y con la ayuda de una micropipeta de 1 ml. llene el tubo con isopropanol (-20°C) y mezcle ligeramente para precipitar el ADN. deje reposar por 60 minutos en el congelador.
7. Centrifugue a 13.000 r.p.m. por 5 minutos Elimine el alcohol.
8. Adicione 1.000 µl de buffer de lavado (76% etanol y 10mM de acetato de amonio) y deje reposar por 20 minutos a temperatura ambiente.
9. Elimine el buffer de lavado invirtiendo el tubo y deje secar al aire.

10. Agregue 100 μ l de T.E. (0,5 M, pH 7.4 y oscuridad) y resuspenda agitando levemente.

Apéndice 2

Estimación de la concentración de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa

1. Prepare 100-200 ml de una solución de agarosa al 0,8% en TBE 0,5X. Caliente hasta que la agarosa se disuelva
2. Cuando la solución se haya enfriado lo suficiente como para sostenerla en la mano, vacíela en la cubeta de electroforesis.
3. Para cada muestra coloque en sendos tubos Eppendorf los siguientes ingredientes: 1 μ l ADN + 17 μ l TE + 2 μ l "buffer" Bpb = 20 μ l
4. Prepare el marcador de pesos moleculares (Fago Lambda/Hind III) adicionando en un Eppendorf: 1 μ l Fago Lambda/Hind III (50 μ g/ μ l) + 17 μ l TE + 2 μ l "buffer" Bpb.
5. Agite cada muestra con un vortex y colóquelas en los pozos del gel con ayuda de una micropipeta. Ubique estratégicamente el marcador de pesos moleculares.
6. Llene la cámara de electroforesis con aproximadamente 1,5 l de "buffer" TBE 0,5X hasta 0,3 cm por encima del gel.
7. Cierre la cámara de electroforesis, coloque adecuadamente los cables y ponga a funcionar hasta que las bandas muestren un adecuado nivel de avance (aproximadamente un hora)
8. Al finalizar la electroforesis coloque el gel en una solución de bromuro de etidio durante 30-60 minutos.
9. Lave el exceso de solución transfiriendo el gel a una bandeja de agua destilada donde permanece 15 minutos.

10. Con la lámpara de luz ultravioleta observe el resultado de la electroforesis y obtenga la fotografía del gel.

11. Determine la concentración de ADN comparando la intensidad de las bandas del marcador de peso molecular con las bandas obtenidas en las muestras.

Apéndice 3

Lista de *Primers* evaluados en el ensayo de variabilidad genética de procedencias de caoba, CATIE, 1998

PRIMER	SECUENCIA BASES (5' a 3')	PESO MOLECULAR	PRIMER	SECUENCIA BASES (5' a 3')	PESO MOLECULAR
OPA1	CAGGCCCTTC	3185	OPH4	GGAAGTCGCC	3273
OPA2	TGCCGAGCTG	3265	OPH5	AGTCGTCCCC	3185
OPA3	AGTCAGCCAC	3216	OPH6	ACGCATCGCA	3216
OPA4	AATCGGGCTG	3288	OPH7	CTGCATCGTG	3240
OPA5	AGGGGTCTTG	3320	OPH8	GAAACACCCC	3184
OPA6	GGTCCCTGAC	3225	OPH9	TGTAGCTGGG	3320
OPA7	GAAACGGGTG	3336	OPH10	CCTACGTCAG	3208
OPA8	GTGACGTAGG	3328	OPH11	CTTCCGCAGT	3200
OPA9	GGGTAACGCC	3273	OPH12	ACGCGCATGT	3248
OPA10	GTGATCGCAG	3288	OPH13	GACGCCACAC	3201
OPA11	CAATCGCCGT	3208	OPH14	ACCAGGTTGG	3288
OPA12	TCGGCGATAG	3288	OPH15	AATGGCGCAG	3296
OPA13	CAGCACCCAC	3161	OPH16	TCTCAGCTGG	3240
OPA14	TCTGTGCTGG	3272	OPH17	CACTCTCCTC	3120
OPA15	TTCCGAACCC	3168	OPH18	GAATCGGCCA	3256
OPA16	AGCCAGCGAA	3214	OPH19	CTGACCAGCC	3193
OPA17	GACCGCTTGT	3240	OPH20	GGGAGACATC	3296
OPA18	AGGTGACCGT	3288	UBC1	CCTGGGCTTC	3217
OPA19	CAAACGTCGG	3256	UBC2	CCTGGGCTTG	3257
OPA20	GTTGCGATCC	3240	UBC3	CCTGGGCTTA	3240
OPB1	GTTTCGCTCC	3192	UBC4	CCTGGGCTGG	3282
OPB2	TGATCCCTGG	3240	UBC5	CCTGGGTTCC	3217
OPB3	CATCCCCCTG	3145	UBC6	CCTGGGCCTA	3225
OPB4	GGACTGGAGT	3328	UBC7	CCTGGGGGTT	3297
OPB5	TGCGCCCTTC	3177	UBC8	CCTGGCGGTA	3265
OPB6	TGCTCTGCCC	3177	UBC9	CCTGCGCTTA	3200
OPB7	GGTGACGCAG	3313	UBC10	GGGGGGATTA	3368
OPB8	GTCCACACGG	3233	UBC35	CCGGGGTTAA	3288
OPB9	TGGGGGACTC	3305	UBC36	CCCCCTTAG	3145
OPB10	CTGCTGGGAC	3565	UBC37	CCGGGGTTTT	3272
OPB11	GTAGACCCGT	3248	UBC38	CCGGGGAAAA	3304
OPB12	CCTTGACGCA	3208	UBC39	TTAACCGGGC	3248
OPB13	TTCCCCCGCT	3137	UBC70	GGGCACGCGA	3173
OPB14	TCCGCTCTGG	3217	UBC71	GAGGGCGAGG	3378
OPB15	GGAGGGTGT	3360	UBC72	GAGCACGGGA	3196
OPB16	TTTGCCCGGA	3240	UBC73	GGGCACGCGA	3173
OPB17	AGGGAACGAG	3344	UBC74	GAGCACCTGA	3256
OPB18	CCACAGCAGT	3216	UBC101	GCGGCTGGAG	3167
OPB19	ACCCCCGAAG	3529	UBC102	GGTGGGGACT	3215
OPB20	GGACCCTIAC	3208	UBC103	GTGACGCCGC	3263
OPH1	GGTCGGAGAA	3336	UBC104	GGGCAATGAT	3200
OPH2	TCGGACGTGA	3288	UBC105	CTCGGGTGGG	3336
OPH3	AGACGTCCAC	3216	UBC535	CCACCAACAG	3184

A = Adenina C = Citocina G = Guanina T = Timina

Apéndice 5.

Resultados del análisis discriminante canónico del ensayo de variabilidad genética de procedencias de caoba, CATIE, 1998

Listado de los grupos, para 6 cluster

OBS	CLUSTER	FAM
1	1	3-131
2	1	3-151
3	2	3-153
4	2	5-35
5	2	3-152
6	2	5-56
7	2	5-64
8	2	1-2
9	2	1-3
10	2	1-6
11	2	1-4
12	3	5-29
13	3	5-46
14	3	5-47
15	3	6-43
16	3	5-55
17	3	6-122
18	3	6-156
19	3	6-243
20	3	6-249
21	4	7-33
22	4	7-35
23	4	7-37
24	4	7-9
25	4	7-10
26	4	7-3
27	4	7-12
28	4	6-250
29	5	6-49
30	5	6-87
31	5	6-61
32	5	6-46
33	5	6-143
34	5	1-1
35	5	6-45
36	5	6-73
37	5	3-101
38	5	6-137
39	6	1-7
40	6	1-14
41	6	3-41

Distancias genéticas entre los Clusters del análisis
discriminante canónico

Del	LUSTER	1	2	3	4	5
	1	0	250,25652	211,65316	187,36711	165,14478
	2	250,25652	0	92,29576	319,73273	83,32880
	3	211,65316	92,29576	0	421,23167	62,05286
	4	187,36711	319,73273	421,23167	0	345,64888
	5	165,14478	83,32880	62,05286	345,64888	0
	6	169,34554	118,34899	132,36515	227,36933	69,77236

Del	CLUSTER	6
	1	169,34554
	2	118,34899
	3	132,36515
	4	227,36933
	5	69,77236
	6	0

Análisis Discriminante canónico
Prueba estadística Univariada

F Statistics, Num DF= 5 Den DF= 28

Variable	Total STD	Pooled STD	Between STD	R-Squared
OPA7_1	0,4478	0,2955	0,3838	0,630617
OPA7_4	0,4104	0,1782	0,4060	0,840094
OPA13_1	0,5075	0,2673	0,4790	0,764706
OPA13_2	0,3870	0,2227	0,3541	0,718915
OPB7_1	0,4306	0,4202	0,2035	0,191774
OPB7_2	0,4104	0,2357	0,3759	0,720165
OPB7_4	0,4749	0,2357	0,4558	0,790953
OPH12_2	0,4306	0,2510	0,3920	0,711672
OPH12_3	0,4478	0,2955	0,3838	0,630617
OPH14_1	0,3870	0,2817	0,3098	0,550265
OPH15_1	0,3870	0,3666	0,2038	0,238261
OPH17_1	0,2388	0,1890	0,1765	0,468750
OPH17_3	0,4749	0,4634	0,2244	0,191809
OPH17_4	0,5066	0,4575	0,3035	0,308063
UBC72_1	0,4933	0,4220	0,3277	0,379019
UBC101_1	0,4933	0,4249	0,3240	0,701099
UBC101_2	0,4851	0,3591	0,3829	0,534933
UBC125_1	0,5066	0,3693	0,4052	0,549093

Los *Primers* en negrita tienen un coeficiente de correlación de más de 0,5

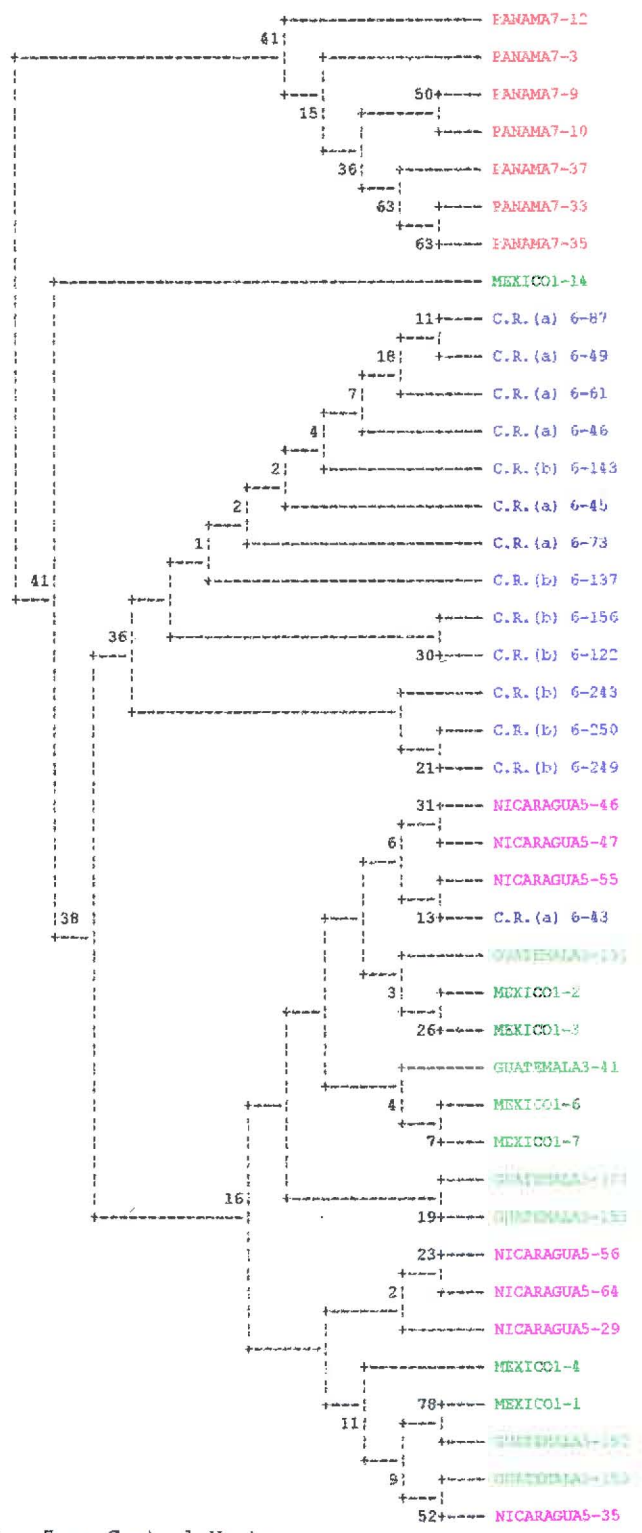
Porcentajes aportados por variable canónica

	Eigenvalue	Difference	Proportion	Cumulative
1	46,3169	29,0224	0,6336	0,6336
2	17,2945	8,0795	0,2107	0,8443
3	9,2150	4,7725	0,0856	0,9299
4	4,4425	2,2378	0,0476	0,9775
5	2,2047	,	0,0225	1,0000

Con dos variables canónicas se explica el 80 % de la variabilidad

Apéndice 6.

Salida del análisis "Bootstrap" mediante el programa MEGA del estudio de variabilidad genética de procedencias de caoba, CATIE, 1998.



(a) = Zona Central Norte
 (b) = Pacifico Seco

Apéndice 7

Resultados de los análisis de varianzas y las pruebas de Tukey para las diferentes variables del ensayo cuantitativo, CATIE, 1998

- a) Andeva y prueba de Tukey para las medias de las alturas en el ensayo de variabilidad genética a nivel cuantitativo de procedencias de *S. macrophylla* a los 106 días

Fuente de variación	GL	S, C	C, Medio	Valor de F	Pr > F
Familias	31	4924,647739	158,859604	16,24	0,0001
Error	564	5516,842328	9,781635		
Total	595	10441,490067			

R-Cuadrado	C, V.	Raíz CME	Promedio de Altura
0,471642	15,64936	3,127561	19,9852349

Fuente de Variación	DF	SC Tipo III	Raíz del CM	Valor de F	Pr > F
PROCEDENCIAS	4	1810,040624	452,510156	46,26	0,0001
FAM (PROC)	27	3205,147842	118,709179	12,14	0,0001

	Grupos Tukey	Promedios	Tratamientos
	A	25,842	3-101
	B A	25,467	6-73
	B A C	24,900	7-10
	B D A C	24,000	7-37
E	B D A C	23,725	6-87
E	B D A C F	23,175	7-9
E	B D G C F	21,812	3-153
E	B D G H C F	21,600	3-131
E	D G H C F	21,475	7-35
E	I D G H C F	21,105	6-61
E	I D J G H C F	21,030	6-156
E	I D J G H F	20,825	3-151
E	I D J G H F	20,800	1-5
E	I D J G H K F	20,263	6-49
E	I D J G H K F	20,125	7-12
E	I L J G H K F	19,921	7-3
M	I L J G H K F	19,658	1-2
M	I L J G H K F	19,654	6-43
M	I N L J G H K F	19,450	1-6
M	I N L J G H K	19,250	3-152
M	I N L J G H K	19,167	7-11
M	I N L J G H K	19,163	6-243
M	I N L J G H K	17,975	1-1
M	I N L J G H K	17,941	6-46
M	I N L J H K	17,750	6-250
M	I N L J K	17,500	1-3
M	N L J O K	17,167	6-122
M	N L O K	16,850	1-3
M	N L O	16,139	6-45
M	N O	15,867	7-33
	N O	15,625	6-143
	O	13,529	6-137

- b) Andeva y prueba de Tukey para las medias de largo de raíz en el ensayo de variabilidad genética a nivel cuantitativo de procedencias de *S. macrophylla* a los 106 días

Fuente de variación	GL	S, C	C, Medio	Valor de F	Pr > F
Familias	31	2767,223052	89,265260	4,11	0,0001
Error	564	12259,964784	21,737526		
Total	595	5027,187836			

R-Cuadrado 0,184148 C,V, 16,52088 Raíz CME 4,662352 Promedio de Largo de Raíz 28,2209732

Fuente de Variación	GL	SC Tipo III	Raíz del CM	Valor de F	Pr > F
PROCEDENCIAS	4	1241,152192	310,288048	14,27	0,0001
FAM (PROC)	27	1526,070859	56,521143	2,60	0,0001

Grupos Tukey					Promedios	Tratamiento
				A	33,579	1-6
			B	A	32,450	6-156
			B	A C	30,647	6-137
			B	A C	30,579	6-243
	E	B	D	A C	30,450	20 8
	E	B	D	A C	30,400	6-73
	E	B	D	A C	30,400	6-143
	E	B	D	A C	30,382	1-1
	E	B	D	A C	29,175	1-5
	E	B	D	A C	29,100	3-152
	E	B	D	A C	28,750	3-131
	E	B	D	A C	28,684	7-3
	E	B	D	A C	28,450	7-9
	E	B	D	A C	28,350	6-250
	E	B	D	A C	28,316	3-101
	E	B	D	A C	28,275	1-2
	E	B	D	A C	28,222	1-4
	E	B	D	A C	28,056	7-10
	E	B	D	C	27,650	1-3
	E	B	D	C	27,562	3-153
	E	B	D	C	27,526	7-12
	E	B	D	C	27,278	6-43
	E	B	D	C	27,050	7-11
	E	B	D	C	27,000	7-9
	E	B	D	C	26,925	7-37
	E		D	C	26,200	7-3
	E		D	C	25,550	6-87
	E		D	C	25,194	6-45
	E		D	C	24,895	6-49
	E		D	C	24,776	6-46
	E		D	C	24,769	6-43
	E		D	C	24,733	7-33

- c) Andeva y prueba de Tukey para las medias de diámetro del tallo en el ensayo de variabilidad genética a nivel cuantitativo de procedencias de *S. macrophylla* a los 106 días

Fuente de variación	GL	S, C	C, Medio	Valor de F	Pr > F
Familias	31	2,43495665	0,07854699	11,35	0,0001
Error	564	3,90394855	0,00692189		
Total	595	6,33890520			

R-Cuadrado	C, V,	Raíz CME	Promedio de D C T
0,384129	17,75048	0,083198	0,46870805

Fuente de Variación	DF	SC Tipo III	Raíz del CM	Valor de F	Pr > F
PROCEDENCIAS	4	1,69876652	0,42469163	61,35	0,0001
FAM (PROC)	27	0,71898084	0,02662892	3,85	0,0001

Grupos Tukey					Promedios	Tratamiento
				A	0,6375	6-156
				B	0,5395	6-243
				B	0,5300	6-143
				B	0,5294	1-1
				B	0,5225	7-9
				B	0,5167	6-122
				B	0,5158	7-12
				B	0,5100	7-35
				B	0,5050	7-37
				B	0,5026	3-101
				B	0,5000	3-131
F	B	E	C	D	0,4917	7-10
F	B	E	C	D	0,4875	7-11
F	B	E	C	D	0,4875	7-3
F	B	E	C	D	0,4867	7-33
F	B	E	C	D	0,4800	6-250
F	B	E	C	D	0,4719	3-153
F	B	E	C	D	0,4706	6-137
F	B	E	C	D	0,4700	3-151
F	B	E	C	D	0,4575	3-152
F	B	E	C	D	0,4575	1-3
F	B	E	C	D	0,4525	1-5
F	B	E	C	D G	0,4361	1-4
F	H	E	C	D G	0,4333	6-73
F	H	E	C	D G	0,4300	1-2
F	H	E		D G	0,4237	1-6
F	H	E	I	G	0,4053	6-61
F	H		I	G	0,3950	6-87
F	H		I	G	0,3895	6-49
	H		I	G	0,3353	6-46
	H		I		0,3306	6-45
			I		0,3192	6-43

- d) Andeva y prueba de Tukey para las medias de materia seca aérea en el ensayo de variabilidad genética a nivel cuantitativo de procedencias de *S. macrophylla* a los 106 días

Fuente de variación	GL	S, C	C, Medio	Valor de F	Pr > F
Familias	31	1679,285515	54,170500	7,38	0,0001
Error	564	4140,313552	7,340981		
Total	595	5819,599067			

R-Cuadrado	C, V,	Raíz CME	Promedio de R M S (p, a)
0,288557	43,45672	2,709425	6,23476510

Fuente de Variación	DF	SC Tipo III	Raíz del CM	Valor de F	Pr > F
PROCEDENCIAS	4	1045,449442	261,362361	35,60	0,0001
FAM (PROC)	27	648,752628	24,027875	3,27	0,0001

Grupos Tukey					Promedios Tratamiento	
			A		10,475	1-1
		B	A		9,340	3-101
		B	A	C	8,215	1-5
		B	D	A	8,011	1-6
E	B	D	A	C	7,515	1-3
E	B	D	A	C	7,390	1-2
E	B	D	A	C	7,388	3-151
E	B	D	A	C	7,386	7-9
E	B	D	A	C	7,305	3-131
E	B	D	A	C	7,138	7-35
E	B	D	A	C F	7,096	6-156
E	B	D		C F	6,904	3-153
E	B	D		C F	6,894	3-152
E	B	D		C F	6,783	6-243
E	B	D	G	C F	6,621	7-12
E	B	D	G	C F	6,559	1-4
E	B	D	G	C F	6,514	6-122
E	B	D	G	C F	5,989	6-73
E		D	G	C F	5,884	7-3
E	H	D	G	C F	5,731	7-37
E	H	D	G	C F	5,532	6-250
E	H	D	G	C F	5,353	7-11
E	H	D	G	C F	5,129	6-87
E	H	D	G	F	4,747	7-10
E	H	D	G	F	4,677	6-49
E	H	D	G	F	4,671	6-143
E	H		G	F	4,549	6-137
E	H		G	F	4,359	6-61
E	H		G	F	4,223	6-143
	H		G	F	3,717	6-46
	H		G		3,304	6-43
	H				2,425	6-45

- e) Andeva y prueba de Tukey para las medias de materia seca de raíz el ensayo de variabilidad genética a nivel cuantitativo de procedencias de *S. macrophylla* a los 106 días

Fuente de variación	GL	S, C	C, Medio	Valor de F	Pr > F
Familias	31	246,4553504	7,9501726	13,15	0,0001
Error	564	340,8958167	0,6044252		
Total	564	340,8958167	0,6044252		

R-Cuadrado	C,V,	Raíz CME	Promedio de R M S (raíz)
0,419605	37,74449	0,777448	2,05976510

Fuente de Variación	DF	SC Tipo III	Raíz del CM	Valor de F	Pr > F
PROCEDENCIAS	4	130,2265439	32,5566360	53,86	0,0001
FAM (PROC)	27	120,2208052	4,4526224	7,37	0,0001

Grupos Tukey				Promedios Tratamiento	
			A	3,999	1-1
		B	A	3,196	1-6
		B	A C	3,137	1-2
		B D	A C	3,077	6-156
		B D	E C	2,896	1-5
F	B	D	E C	2,507	3-101
F	B	D	E C G	2,294	3-153
F	B	D	E C G	2,249	6-73
F		D	E C G	2,219	3-131
F		D	E C G	2,164	7-3
F		D	E G	2,152	7-37
F		D	E G	2,109	6-243
F		D	E G	2,108	1-3
F		D	E G	2,105	3-151
F			E G	2,100	1-4
F	H		E G	2,054	7-9
F	H		E G	2,036	7-35
F	H		I G	1,889	6-61
F	H		I J G	1,868	3-152
F	H		I J G	1,859	7-3
F	H		I J G	1,840	6-143
F	H		I J G	1,697	6-122
F	H		I J G	1,693	7-33
F	H		I J G	1,677	6-87
F	H		I J G	1,610	6-137
F	H		I J G	1,554	7-11
		H	I J G	1,472	6-49
		H	I J G	1,453	6-250
		H	I J G	1,437	7-10
		H	I J	1,101	6-43
			I J	1,031	6-46
			J	0,906	6-45

- f) Andeva y Prueba de Tukey para las medias de materia seca aérea / materia seca de raíz el ensayo de variabilidad genética a nivel cuantitativo de procedencias de *S. macrophylla* a los 106 días

Fuente de variación	GL	S, C	C, Medio	Valor de F	Pr > F
Familias	31	238,8645047	7,7053066	1,59	0,0238
Error	565	2737,8122122	4,8456853		
Total	596	2976,6767169			

R-Cuadrado	C,V,	Raíz CME	Prom RMS(aérea) / RMS (raíz)
0,080245	78,55177	2,201292	2,80234506

Fuente de Variación	DF	SC Tipo III	Raíz del CM	Valor de F	Pr > F
PROCEDENCIAS	4	40,0243986	10,0060996	2,06	0,0840
FAM (PROC)	7	201,2332250	7,4530824	1,54	0,0416

Grupos Tukey	Promedios	Tratamiento
A	4,778	7-10
B	3,722	6-122
B	3,706	6-46
B	3,688	7-33
B	3,500	6-250
B	3,250	1-3
B	3,211	3-101
B	3,200	7-9
B	3,200	3-151
B	3,154	6-43
B	3,150	7-11
B	3,050	7-35
B	3,000	7-3
B	2,950	3-131
B	2,789	6-49
B	2,778	1-4
B	2,737	6-243
B	2,650	6-87
B	2,526	6-61
B	2,500	3-152
B	2,500	3-153
B	2,421	7-12
B	2,353	1-1
B	2,350	1-5
B	2,333	6-45
B	2,294	6-137
B	2,250	7-37
B	2,200	6-73
B	2,105	1-6
B	1,900	6-156
B	1,850	6-143
B	1,850	1-2

Apéndice 8

Costos de Procesamiento de Muestras de RAPD's (Método CTAB Minipreparaciones)

(a) 1. Extracción de ADN y Determinación de su cantidad y calidad

1.1 Buffer de extracción CTAB

REACTIVO	Peso Molecular	g/L	Costo en \$	Costo/Muestra/ \$
Tris-Hcl	121.1	12.11	1.02	0.0012
EDTA Na ₂	372.2	7.44	.063	0.0063
NaCl ₂	58.44	81.82	2.63	0.00263
CTAB2% p/v		20.00	8.16	0.00816
2-mercapto etanol		2ml	0.13	0.0013
Sub Total				0.02

1.2 Otras Sustancias

SUSTANCIA	Cantidad/Muestra	Costo en \$	Costo/Muestra en \$
Nitrógeno Líquido	75 ml	0.591	0.044
Etanol	1.5 ml	3.70 l	0.00555
Acetato de Amonio 10mM	.077 g	46.80 /kg	0.00360
Cloroformo-Isomyl, Alch.	0.800 µl	48.151	0.1456
Bromofenol Azul	2 µl	2.18/50ml	0.00009
T.E.	117 µl		0.003
Agarosa	0.04 g	740.2/500g	0.0592
Sub Total			0.26

1.3 Materiales

Tipo	Cant/Muestra	Precio \$	Precio/Unidad \$	Costa/Muestra \$
Eppendorf 1.5 ml	3	203.11/5000	0.041	0.123
Eppendorf 0.650 ml	2	36/1000	0.036	0.072
Puntas 1,000µl	3	30.01/1000	0.0300	0.09
Puntas 200µl	3	24.60/1000	0.0246	0.0738
Puntas 10µl	2	23.72/1000	0.02372	0.04744
Guantes	5	4.65/100 Unidades	0.0465	0.2325
Película Fotográfica	1 Exposición	20.01/20 Exp	1.0005	0.10005
Sub Total				0.74

1.4 Costo/Muestra de extracción y determinación de la cantidad y calidad de ADN

Buffer de Extracción + Otras Sustancias + Materiales =

$$0.02 + 0.26 + 0.74 = 1.02$$

Apéndice 8

(b) Costos de Procesamiento de Muestras de RAPD's (Método CTAB Minipreparaciones)

Análisis RAPD's Y Electroforesis

2.1 Buffer TBE 5x

Reactivo	Peso/Mol g	g/1L	Costo \$	Costo/Muestra
Tris 1M	121.1	5.44	79.1 / Kg	0.027
EDTA	372.2	0.69	95.5 / Kg	0.0041
Ácido Bórico	61.83	2.75	38.4 / Kg	0.0065
Sub Total				0.0376

*2.5 L de buffer alcanzan para 40 muestras

2.2 Otras Sustancias

Sustancia	Cantidad/Muestra	Precio \$	Costo / Muestra
dNTP	0.60µl	50.00/set	0.0234
Taq-Polimerasa	3.33 Unidades	980/6,000 Unidades	0.54
Primer	5 µl	150/ Kit	0.3
Agarosa	0.1 g	740.2/500 g	0.15
Bromuro de Etidio	0.0005µg	80.00/5g	0.000008
Escalera 123 pb	239/250µg	0.0053	0.005
Sub-Total			1.00

2.3 Materiales

Tipo	Cantidad/Muestra	Precio \$	Precio/Unidad \$	Costo/Muestra
Tubos PCR	1	110.00/1000	0.11	0.11
Tapas PCR	1	94.50/250	0.38	0.38
Puntas 1 ml	3	30.01/1000	0.0300	0.09
Puntas 200µl	4	24.6/1000	0.0246	0.0984
Puntas de 10µl	6	23.72/1000	0.02372	0.14232
Guantes	3	4.65/100 Unidad	0.0465	0.1395
Película Fotograf	1 Exposición	20.01/20 Exp	1.0005	0.10005
Sub Total				1.06

2.4 Costo del Análisis RAPD's y Electroforesis =

$$\begin{array}{rclclcl}
 \text{Buffer 5x} & + & \text{Otras sustancias} & + & \text{Materiales} & \\
 0.0376 & + & 1.00 & + & 1.06 & = 2.10
 \end{array}$$

Apéndice 9

Dendograma que ilustra el resultado de las agrupaciones de *S. macrophylla* en el estudio de los padres realizado por Wilson *et al.*, 1997

