MAESTRÍA EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS

Variación y estructura genética de *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae) en la Península de Yucatán y Sur de Veracruz, México

Tesis que para obtener el grado de Maestro en Ciencias presenta:

José Enrique Trujillo Sierra

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C.
Mérida, Yucatán, México.

2010

Declaración de Propiedad

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento provienen de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán y que dicha información le pertenece en términos de la ley de propiedad industrial, por lo que no me reservo ningún derecho sobre ello.

José Enrique Trujillo Sierra

Contenido

AGRADECIMIENTOS i
ÍNDICE DE CUADROS iii
ÍNDICE DE FIGURAS iv
RESUMEN v
ABSTRACT vi
INTRODUCCIÓN 1
1. Antecedentes 3
1.1. Estatus de las poblaciones de *Swietenia macrophylla* King 3
1.1.1. Distribución geográfica. 3
1.1.2. Características biológicas 3
1.1.3. Época de floración, fructificación y agentes polinizadores 5
1.1.4. Parámetros de la diversidad genética 6
1.1.5. Marcadores moleculares 7
1.1.6. Utilización de los marcadores moleculares en el género *Swietenia* Jacq. 8
1.1.7. La biología de la conservación 11
2. Hipótesis 13
3. Objetivos 13
3.1. Objetivo general..... 13
3.2. Objetivos específicos..... 13
4. Materiales y Métodos 15
4.1. Sitios de colecta 15
4.2. Trabajo de campo 16

4.3. Extracción de ADN 16

4.4. Cuantificación del ADN 17

4.5. Marcadores moleculares: Microsatélites nucleares (SSRn) 18

4.6. Amplificación mediante PCR 19

4.7. Productos amplificados 19

4.8. Geles de poliacrilamida 19

4.9. Tinción con nitrato de plata 20

4.10. Lectura de datos 20

4.11. Frecuencias genotípicas y alélicas 21

4.12. Análisis de la diversidad genética y estructura genética 21

4.13. Relaciones genéticas 22

4.14. Patrones de aislamiento por distancia 22

5. Resultados 23

5.1. Riqueza alélica 23

5.2. Diversidad genética y equilibrio de Hardy Weinberg .. 25

5.3. Estructura genética 28

5.4. Aislamiento por distancia..... 30

5.5. Relaciones genéticas.... 30

6. Discusión 33

6.1. Variación y estructura genética 33

6.2. Flujo genético y aislamiento por distancia..... 34

6.3. Relaciones genéticas 34

6.4. Recomendaciones para la conservación 36

7. Conclusiones 37

8. Perspectivas 39

9. Literatura citada 41

Agradecimientos

A la Dra. Patricia Delgado Valerio de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, UMSNH. y a la Dra. Ivón Ramírez Morillo del Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C. por la codirección y por compartir sus conocimientos, dedicación y tiempo para la realización de este trabajo.

Principalmente a Virginia Rebolledo Camacho del Instituto de Genética Forestal de Veracruz y Amílcar Castillo Herrera del Centro de Investigación Científica de Yucatán, por toda la ayuda y conocimientos dados en todo el tiempo que duró este trabajo de investigación, asimismo agradecer a Francisco Chi May y Angélica Navarro por su apoyo en la colecta de material y trabajo de campo. También al personal de la Unidad de Recursos Naturales del Centro de Investigación Científica por compartir el área de trabajo y sus conocimientos: Patricia Flores, Julián Coello, José Luis Tapia y Paulino Simá; asimismo a Merari Ferrer por la ayuda con materiales de laboratorio, y al Dr. Germán Carnevali por su ayuda en la traducción del resumen.

También a la Unidad de Biotecnología, específicamente al Dr. Felipe Sánchez por la ayuda proporcionada en el uso de sus equipos de laboratorio; un agradecimiento a Martín Bautista por habernos proporcionado las muestras de caoba Veracruz, a la Dra. Cecilia Rodríguez por compartir sus conocimientos en cuanto a metodología e importantes sugerencias; al Dr. Andrew James por la utilización de sus equipos; a Leticia Peraza, Miguel Montoy Domínguez y Adriana Quiroz, gracias por compartir sus conocimientos.

A los integrantes del sínodo: M. C. Nidia Pérez, Dr. Jaime Martínez y Dr. Felipe Sánchez por sus valiosos comentarios al manuscrito de la tesis.

Finalmente agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de Maestría que se me otorgó, y por el financiamiento del proyecto 44373 de la Dra. Patricia Delgado, con lo cual se logró realizar este trabajo de investigación.

Dedicatoria

En el camino de la vida he encontrado que la belleza de un sueño toma forma si tienes la capacidad de la visualización. Si dominamos la mente y pensamos solo en cosas positivas y creativas sin dudar en nuestras capacidades, el mundo se abre a tus pies, con la misma energía positiva que emana de ti.

Para mi madre Elba que es una trabajadora imparable, gracias por tu apoyo y por creer en mí.

A mi padre José dedicado para ti.

A mi tía Beatriz sin ti no hubiese logrado este trabajo, gracias por tu ayuda y siempre contarás conmigo.

A mis tías Ofelia y Elva, gracias por su apoyo incondicional, también trabajadoras imparables.

A Gustavo, Ricardo, Mauro, Víctor, Geovana, Lineta, Alfredo, Juan Pablo, Nuvia, Lucy y Miguel, gracias por sus consejos y por estar en los momentos difíciles.

Índice de cuadros

Páginas

Cuadro 1. Marcadores moleculares utilizados en estudios de genética de poblaciones modificado de Outborg *et al.* (1999) y Ferreira-Grattapaglia (1998) 8

Cuadro 2. Coordenadas geográficas de las poblaciones muestreadas de *Swietenia macrophylla* King 15

Cuadro 3. Secuencias de oligonucleótidos, motivos repetidos, número de alelos y tamaño de fragmentos para cinco microsatélites (Lemes *et al.,* 2002; White and Powell, 1997) 18

Cuadro 4. Frecuencias de alélicas de cinco microsatélites para siete poblaciones de *Swietenia macrophylla* King de la Península de Yucatán y sur de Veracruz, México 26

Cuadro 5. Diversidad genética de siete poblaciones de *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae) 28

Cuadro 6. Resultados de AMOVA para siete poblaciones de *Swietenia macrophylla* King..... 29

Cuadro 7. Estadísticos *F* de Wright, flujo genético (*Nm*), estructura genética (F_{ST}) y tamaño efectivo (*Ne*) a partir de *Nm* de cinco loci polimórficos 29

Cuadro 8. Flujo genético entre pares de poblaciones (*M*= *Nm*)..... 30

Cuadro 9. Estudios de estructura y variación genética de *Swietenia macrophylla* King inferidas con SSRn, AFLP's y RAPD's 35

Índice de figuras

Páginas

Figura 1. Distribución de *Swietenia macrophylla* King, *Swietenia mahogani* Jacq., *Swietenia humilis* Zucc. en Mesoamérica (Bauer y Francis, 1998) 4

Figura 2. Morfología de *Swietenia macrophylla* King: a) rama con flor; b) flor masculina; c) flor femenina; d) fruto; e) semilla (Pennington, 1981) 5

Figura 3. Ubicación geográfica de las poblaciones naturales de *Swietenia macrophylla* King en estudio, distribuidas en la Península de Yucatán y Sur de Veracruz 16

Figura 4. Gel de poliacrilamida con los patrones de bandas de las poblaciones de Nueva Becal y el Tormento para el microsatélite mac52 23

Figura 5. Gel de poliacrilamida con los patrones de bandas de la población de Nueva Becal para el microsatélite mac49 24

Figura 6. Gel de poliacrilamida con los patrones de bandas de las poblaciones de Punta Laguna, Pioneros y El Tormento para el microsatélite mac83..... 24

Figura 7. Gel de poliacrilamida con los patrones de bandas de la población de Punta Laguna para el microsatélite sm01 25

Figura 8. Análisis de aislamiento por distancia entre pares de poblaciones 31

Figura 9. Relaciones genéticas de las poblaciones de *Swietenia macrophylla* King, obtenidas con las distancias genéticas de Golstein (δμ), con base en el método de UPGMA (Análisis Jerárquicos de Conglomerados). Bootstrap basados en1000 repeticiones (Felsenstein, 1985) 31

Resumen

El género *Swietenia* Jacq., incluye a especies productoras de madera, como *Swietenia macrophylla*, la cual es ampliamente explotada en Centroamérica y México, con gran demanda en EUA y Europa, por lo cual sus poblaciones se han reducido drásticamente y actualmente es catalogada como especie amenazada de extinción local. Por tanto, es necesaria la generación de estudios relacionados con la genética de poblaciones, información que es de gran utilidad para el planteamiento de estrategias de manejo y conservación. En este estudio se realizaron estimaciones de la variación y estructura genética, el tamaño efectivo y el flujo genético de las poblaciones de *S. macrophylla* en la Península de Yucatán Sur de Veracruz, México. Se colectó material foliar y de raíces en un total 93 árboles en siete localidades. Se usaron cinco microsatélites núcleares (SSRn) polimórficos. La variación genética se estimó mediante el número de alelos por locus, la heterocigosis esperada y observada. La estructura genética se determinó con el modelo de mutación de un paso SMM (R_{ST}) a través de un análisis jerárquico de varianza molecular (AMOVA). Los resultados indican valores intermedios de variación genética (H_E= 0.482) con los mayores y menores niveles de variación genética encontrados en las poblaciones del Tormento (TOR5) de Campeche (H_E= 0.551) y Pioneros (PIO3) de Quintana Roo (H_E= 0.416), respectivamente. La diferenciación genética fue moderada pero significativa (F_{ST} =0.086: P= 0.005), por lo que el promedio del flujo genético (Nm= 2.657) fue alto. El análisis de UPGMA formó dos grupos de acuerdo con su distribución geográfica; el primero estuvo conformado por las poblaciones de Punta Laguna (PL2) y Caobas (CA1) (Quintana Roo), y el segundo grupo por el resto de las poblaciones. Con base en esta información se sugiere la conservación prioritaria de la población de PIO3, ya que es la que presentó los menores niveles de variación genética y es la de mayor importancia desde el punto de vista filogenético, al ser la población más basal o ancestral. Igualmente, las poblaciones de TOR5 y el RE4 presentaron la mayor diversidad genética y pueden ser las poblaciones representativas del acervo genético de *S. macrophylla* en México.

Abstract

The genus *Swietenia* Jacq., includes species such as *Swietenia macrophylla*, that are important sources of timber and which are widely exploited in Central America and Mexico. The wood of this species is in high demand in USA and Europe; this fact has led to drastic reductions of its populations, thus, the species has been identified as being endangered, with high risk of local extinctions. For all these reasons, it is necessary to generate data related to population genetics of *Swietenia macrophylla*. This information would be an invaluable tool to design strategies for the successful management and conservation of the species. In the current study we estimated the genetic variation and structure, effective population size, and gene flow in populations of *S. macrophylla* in the Yucatan Peninsula and southern Veracruz State in México. Foliar and root material was collected from a total of 93 individual trees in seven localities. With the use of five polymorphic nuclear microsatellites (SSRn), genetic variation was estimated based on number of alleles per locus, and expected and observed heterocigocity. Genetic structure was evaluated with one step mutation model SMM (R_{ST}) and through the jerarquic molecular variance (AMOVA). Results indicate intermediate values of genetic variation (H_E= 0.482) with the highest (H_E= 0.551) and lowest (H_E= 0.416) values of genetic variation in El Tormento (TOR5) from Campeche and Pioneros population (PIO3) in Quintana Roo, respectively. Genetic differentiation values were moderate but significant (F_{ST} =0.086: P= 0.005), with high gene flow (Nm= 2.657). Results of UPGMA indicate two groups according to geographical distribution; the first one with populations of Punta Laguna (PL2) and Caobas (CA1) (both from Quintana Roo), and the second group with the remaining populations. The information emanating from this study suggests that conservation emphasis should be placed on population PI03 since it presented the lowest values of genetic variation and the most ancestral position of all evaluated populations. Likewise, populations TOR5 and RE4 presented the highest diversity and should be considered as the most representative populations of the genetic pool of the studied populations of *Swietenia macrophylla* in Mexico.

Introducción

México es uno de los países con mayor biodiversidad del mundo, parte de esta diversidad se encuentra en sus bosques que contienen a más del 40% de los recursos forestales (CONAFOR, Inventario Forestal Nacional, 1994). Dentro de los recursos forestales contamos con miembros de la familia Meliaceae, un grupo con una amplia distribución en América, África y Asia, con 50 géneros y 1000 especies (Navarro, 1999).

Las Meliaceae agrupan a los géneros *Swietenia* Jacq. y *Cedrela* P. Browne, los cuales en Mesoamérica ocupan el primero y segundo lugar respectivamente como los recursos forestales con mayor demanda en la producción de madera (Navarro, 1999; Navarro y Hernández, 2004).

El género *Swietenia* incluye a tres especies: *Swietenia mahogani* Jacq., *S. macrophylla* King y *S. humilis* Zucc. Sin embargo, en México solo encontramos a *S. macrophylla* y *S. humilis,* esta última ampliamente explotada en el pasado y debido a esto es catalogada en peligro de extinción (CITES: Apéndice II-2002). Actualmente, en Mesoamérica la principal extracción de madera de caoba es de la especie *S. macrophylla,* con alta demanda en EUA y Europa (Patiño 1997). La sobreexplotación de *S. macrophylla* ha provocado que las poblaciones en Mesoamérica continúen disminuyendo y por consecuencia sea clasificada como especie amenazada de extinción local (CITES: Apéndice II-2002). Por lo tanto, es fundamental realizar estudios sobre el estatus genético de las poblaciones de *S. macrophylla* en México, en específico estimaciones de los niveles de variación genética intra e inter poblacional, que permitan identificar las poblaciones de mayor valor genético para fines de conservación y en futuros estudios de mejoramiento genético (Novick *et al.,* 2003).

Actualmente existen varios estudios sobre la variación genética en poblaciones de caoba en Mesoamérica y Brasil (Céspedes *et al.* 2003; Lowe *et al.* 2003; Lemes *et al.* 2003; Gillies *et al.* 1999). Sin embargo, en varios de estos estudios realizados con RAPD´s (Fragmentos polimórficos de ADN Amplificados al Azar) se han incluido poblaciones de México, como: El Naranjal y San Felipe (Quintana Roo) y Madrazo (Campeche) en donde se encontró que el 80% de la variación genética se encuentra dentro de las poblaciones (Gillies *et al.* 1999). Sin embargo, solo existe un estudio realizado con microsatélites nucleares en poblaciones de Mesoamérica en donde incluyen una localidad de México ubicada en Nueva Becal, Campeche. En este estudio reportan un nivel de variación genético relativamente alto (H_E= 0.681) en comparación con las otras poblaciones de Centroamérica (H_E =0.653) (Novick *et al.* 2003). Por tanto, es de gran importancia realizar estudios

de *S. macrophylla* en el Sur de México, donde existen poblaciones que aún no han sido estudiadas genéticamente.

El presente estudio se enfoca en el análisis de los niveles de variación y estructura genética de las poblaciones mexicanas de caoba; se prueban hipótesis relacionadas con los procesos que están implicados en la distribución espacial y temporal de la variación genética de las poblaciones. Finalmente la información obtenida permitirá a futuro la generación de propuestas específicas de manejo y conservación de las poblaciones.

1. Antecedentes

1.1. ESTATUS DE LAS POBLACIONES DE *Swietenia macrophylla* King

Swietenia macrophylla es una especie que tiene varios nombres comunes, se conoce como "caoba" y "caoba hondureña" en español, "mogno" en portugués y "mahogany" o "bigleaf mahogany" en inglés. Esta especie junto con *Cedrela odorata* L., "cedro" son las especies más importantes de la familia Meliaceae desde el punto de vista económico, debido a que en México y Centroamérica tienen un gran potencial comercial en la industria maderera (Patiño, 1997).

1.1.1. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

La caoba (*S. macrophylla)* se distribuye desde México hasta Brasil, crece de forma natural en México (Sur de Tamaulipas, distribuida por el litoral del Atlántico hasta la Península de Yucatán) y en Centroamérica desde Belice hasta Panamá, principalmente Guatemala (Petén), Belice, Honduras (La Mosquitia, Colón, Atlántida, Olancho), Nicaragua (La Mosquitia), Costa Rica, en la zona Atlántica Norte (Los Chiles, Upala), la zona pacífica: Guanacaste, Punta Arenas, Puriscal, Turrubares y Orotina; y en Panamá (Darién, Azuero); y continúa a través del noroeste de Sudamérica por la periferia de la alta Amazonía en Colombia, Venezuela, Ecuador y Perú hasta Bolivia y la Amazonía del Sur en Brasil (Figura 1) (Navarro, 1999; Patiño, 1997)

1.1.2. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS

La caoba es un árbol de aprox. 40 a 50 m de altura y 1.5 m de diámetro en el tronco, con corteza fisurada, hojas de color verde oscuro, hojas paripinnadas, alternas, de 6 a 12 foliolos glabros, sin glándulas, raquis sin crecimiento terminal, con tres o más pares de foliolos. Las flores son de color pardo amarillento, pequeñas, con olor agradable, en panículas, unisexuales y con vestigios bien desarrollados del sexo opuesto, es decir, que son árboles monoicos, con flores femeninas y masculinas en cada inflorescencia. Los frutos son cápsulas ovoides a piriformes de 12 a 20 cm de largo, se abren en cinco válvulas de color café con semillas café, color caoba o pardas y aladas (Figura 2) (Navarro, 1999).

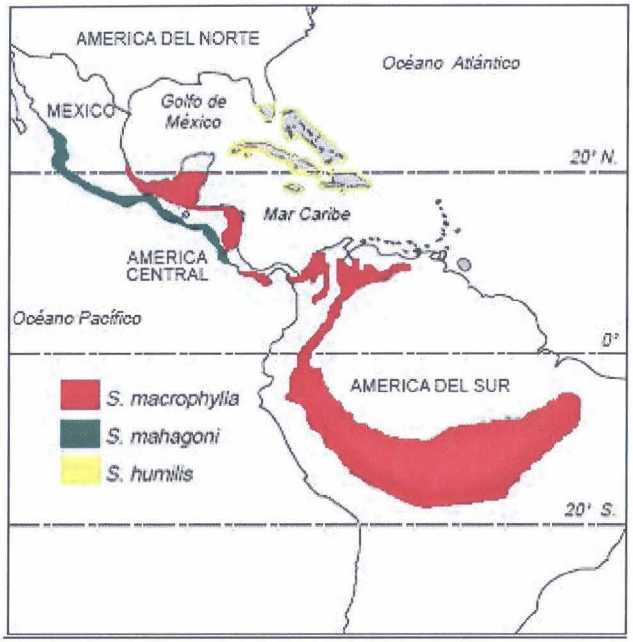

Figura 1. Distribución de *Swietenia macrophylla* King, *Swietenia mahogani* Jacq., *Swietenia humilis* Zucc. en Mesoamérica (Bauer y Francis, 1998).

Figura 2. Morfología de *Swietenia macrophylla* King: a) rama con flor; b) flor masculina; c) flor femenina; d) fruto; e) semilla (Pennington, 1981).

1.1.3. ÉPOCA DE FLORACIÓN, FRUCTIFICACIÓN Y AGENTES POLINIZADORES

Patiño (1997) menciona que el periodo de floración para *Swietenia macrophylla* en Campeche y Quintana Roo es de abril a junio, mientras que la producción de semillas sucede de febrero a abril. En Centroamérica, Patiño (1997), señala que la producción de semillas varía enormemente de acuerdo a las áreas donde se distribuye esta especie. Así por ejemplo: en Panamá su producción se lleva a cabo en noviembre, y en Costa Rica ocurre a finales de noviembre y principios de diciembre; en Nicaragua en la Costa Atlántica sucede en enero y febrero; en Honduras ocurre en febrero y marzo en las zonas altas (700 msnm); en el Petén Guatemala se colectan semillas en febrero y marzo, así como en la mayoría de las áreas de Belice. Por tanto, es importante mencionar que se ha encontrado una variación en la fenología entre árboles dentro de las mismas áreas de producción de hasta un mes.

Styles y Khosla (1976), reportados por Patiño (1997), indican que las Meliáceas están fuertemente asociadas a la entomofilia, y que los principales vectores son las abejas y mariposas nocturnas. Howard *et al.* (1995), reportado por Patiño (1997), señalan para *Swietenia*, específicamente para *S. mahogani* en estudios realizados en Florida (EUA), la presencia de otros agentes polinizadores, tales como los trips (Thysanoptera), encontrados entre el 12% y 50% de las flores examinadas, principalmente estaminadas, en sitios de muestreo separados entre 27 a 82 km. La mayoría de estos trips presentaban polen de *Swietenia* en su cuerpo, esto fundamenta lo reportado, debido a que se observaron moviéndose hacia dentro y fuera de los tubos estaminales, entre este y el estigma, principalmente a través de una hendidura lateral, lo que incrementa el contacto entre los trips, la antera y el filo del estigma, provocando la polinización. En las selvas de dosel continuo se esperaría que estos insectos vuelen distancias cortas y, entonces se podría estimar el flujo de genes mediante el comportamiento de estos insectos.

Por otro lado, cuando el tamaño de los fragmentos de selva disminuye, la separación entre los fragmentos aumenta y, entonces el número de eventos de polinización a larga distancia se ven favorecidos con la influencia del viento. (Lowe et al. 2003). White *et al.* (1998) citado por Lowe *et al.* (2003) supone que *Swietenia* es posible el flujo genético a larga distancia en selvas fragmentadas, pero no es así selvas continuas o perturbadas.

1.1.4. PARÁMETROS DE LA DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA

La variación genética se refiere a la diversidad (el número de variantes y la frecuencia de cada alelo en la población) o riqueza de variantes (el número de variantes o alelos) (Hartl and Clark, 1997). Estas variantes en un conjunto dado de muestras (población) crean el polimorfismo. Entre los índices de diversidad genética más comunes están: la heterocigosis esperada (H_E), la heterocigosis observada (H_O), el porcentaje promedio de loci polimórficos (P), el promedio de número de alelos por locus (A), número efectivo de alelos (Ae) y la diversidad genética (H) (Hartl and Clark, 1997).

La estructura genética de las poblaciones es una consecuencia de los patrones de entrecruzamiento dentro de las poblaciones, de su historia de vida y la magnitud del intercambio genético (Hart y Clark, 1997). Para conocer como está estructurada esta variación genética entre poblaciones de una especie determinada, se evalúan los genotipos de los diferentes individuos que conforman las poblaciones con base en diferentes índices o estimadores de Wright (1978): El índice de

endogamia (F_{IS}), diferenciación genética (F_{ST} o R_{ST}) y diferenciación genética total (F_{IT}). Estos permiten comparar los efectos de la estructural poblacional, en esencia determinan como se reparten la endogamia a distintos niveles jerárquicos. El flujo genético (*Nm*) corresponde al movimiento de alelos entre poblaciones, incluyendo todos los movimientos de gametos o individuos y que determinan el cambio de la distribución espacial de los genes (Slatkin, 1994). Por tanto, existe una relación inversa entre el flujo genético y la estructura genética de las poblaciones, donde a mayor flujo genético menor diferenciación genética entre poblaciones (Slatkin, 1994). Por su parte, el tamaño efectivo de las poblaciones (*Ne*) corresponde al número de progenitores encargados de la composición genética de la siguiente generación. En lo referente a la conservación, el tamaño efectivo (*Ne*) es uno de los parámetros fundamentales, porque nos indica el número mínimo de individuos que contribuyen en la adecuación de las especies, lo que es indispensable para mantener el acervo genético de éstas, así como delimitar zonas específicas de protección (Slatkin y Barton, 1989).

1.1.5. MARCADORES MOLECULARES

Los marcadores moleculares son las herramientas más eficientes y precisas en los estudios de genética de poblaciones, pero es indispensable utilizar los adecuados según el estudio a realizar; si el tema a tratar se enfoca en determinar genotipos y los niveles de variación genética, entonces podemos mencionar a las isoenzimas, RFLP´s (Fragmentos de Restricción Polimórficos), RAPD´s (Fragmentos Polimórficos de ADN Amplificados al Azar), SSRn (Microsatélites nucleares), AFLP´s (polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados), entre otros (Cuadro 1).

En el inicio, los marcadores moleculares más utilizados eran las isoenzimas, porque tenían bajos costos y eran eficientes para detectar individuos heterocigotos, codominantes, pero también tenían grandes desventajas porque las muestras utilizadas eran frescas, lo que dificultaba su transporte de campo a laboratorio, además de que a nivel polimórfico detectaban un número pequeño de regiones codificadas, regiones limitadas del genoma, y esto acrecentaba más la subestimación de la diversidad genética (Lowe *et al.,* 2003, Brown *et al.,* 1989).

Cuadro 1. Marcadores moleculares utilizados en estudios de genética de poblaciones (modificado de Outborg *et al.,* 1999 y Ferreira-Grattapaglia, 1998).

Variable	RFLP	RAPD	SSR	AFLP
	Corte	Amplificación	Amplificación	Corte y Amplificación
Polimorfismo	Moderado	Moderado	Alto	Alto
No de Loci	1-3	1-10	1	Muchos
Expresión genética	Codominante	Dominante	Codominante	Dominante
Detección	Radioactividad	Bromuro de Etidio	Nitrato de plata	Bromuro de Etidio
Costo	Intermedio	Bajo	Alto	Alto

Actualmente, los microsatélites proporcionan más información molecular. Los microsatélites son regiones de secuencias simples repetidas (de 1 a 6 pares de bases). Las series arregladas que se repiten pueden ser mononucleótidos (T)n, dinucleótidos (AT)n, trinucleótidos (TAA)n o tetranucleótidos (AAGG)n. Estos loci se encuentran en regiones codificantes y no codificantes del ADN (Freeland, 2005). En lo particular los marcadores microsatélites nucleares (SSRn), son recomendables, debido a que son altamente polimórficos, codominantes, se segregan de manera mendeliana (Azofeifa-Delgado, 2006; García de León, 2001; Ferreira y Grattapaglia, 1998). Además, todo el desarrollo teórico de la genética de poblaciones puede ser aplicado para estas regiones. Los SSRn se utilizan para definir la variación y la estructura genética, el flujo genético, los niveles de endogamia, el tamaño efectivo de las poblaciones, las tasas de crecimiento de las poblaciones y para la delimitación de taxa muy cercanas o para el análisis de la estructura genética por debajo del nivel de especie, como formas o variedades (Azofeida-Delgado, 2006; Novick *et al.*, 2003; García de León, 2001; Ferreira y Grattapaglia, 1998).

1.1.6. UTILIZACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES EN EL GÉNERO *Swietenia* Jacq.

Lo primero a realizar en un trabajo de investigación con microsatélites es la secuenciación del genoma de la especie en estudio y luego conocer las secuencias acompañantes o "flancos" de las secuencias repetidas simples o motivos repetidos y entonces diseñar los iniciadores y, realizar ensayos para supervisar la reproducibilidad de los microsatélites. Para el análisis de una nueva especie generalmente se

tiene que volver a aislar y caracterizar nuevos marcadores, esto es lo más costoso y limitante del uso de los microsatélites (Azofeifa-Delgado, 2006; Ferreira y Grattapaglia, 1998). Por lo tanto, cuando no se cuenta con los recursos se pueden utilizar marcadores de especies del mismo género, como el caso de *S. humilis* y *S. macrophylla* (Céspedes *et al.*, 2003).

Los primeros microsatélites de caoba que se aislaron y caracterizaron fueron en *Swietenia humilis* porque es una de las tres especies de árboles tropicales maderables más importantes y explotados del género. A partir de la generación de estos microsatélites, se lograron realizar estudios sobre la diversidad genética en varias localidades de Centroamérica. White y Powell (1997), aislaron y caracterizaron microsatélites (SSRs) de *S. humilis* en poblaciones de las costas del Pacífico de Honduras (Punta Ratón en Choluteca). Se obtuvieron 10 loci polimórficos y un promedio de alelos de 9.7. La heterocigocidad observada fue de 0.415, la estructura genética (F_{ST}) de 0.036, y el flujo genético (*Nm*) mayor que 1. White y Powell (1997) consideran que la baja estructura genética se pudo deber a un extenso flujo de genes entre árboles debido a las condiciones de viento entre fragmentos aislados de selva o a la polinización con árboles vecinos (60%) en bloques grandes de selva.

White *et al.* (1999), reportaron la variación genética de *S. humilis* mediante el uso de SSRn, en poblaciones del Pacífico en Honduras (región Punta Ratón). Identificaron 112 alelos totales, con una moderadamente alta variación genética (H_E= 0.548), la mayoría de la variación fue dentro de las poblaciones, una pequeña diferenciación genética (R_{ST}= 0.032), un flujo genético (*Nm*= 8.9) alto entre los sitios, posiblemente debido a la estructura de los árboles que se encuentran en una selva continua. El nivel de endogamia (F_{IS}= 0.223) dentro de las poblaciones fue significativamente alta.

Por otra parte, Gillies *et al.* (1999) realizaron estudios de diversidad genética de *S. macrophylla* mediante RAPD's, en Mesoamérica, incluyendo poblaciones del sureste de México (El Naranjal y San Felipe en Quintana Roo y Madrazo en Campeche). La diversidad genética (H_E) fue alta (0.450), con 80 % de la misma dentro de las poblaciones y 23.9% entre poblaciones. Gillies *et al.* (1999) indican que el mayor grado de diferenciación poblacional está relacionado con la disminución del flujo genético, ya que sugieren que la polinización es realizada por insectos del género *Thrips,* los cuales no pueden moverse a grandes distancias.

Lemes *et al.* (2002) también aislaron y caracterizaron microstélites (SSRn) pero en *S. macrophylla*, en el Sur de la región amazónica de Brasil. Se obtuvieron 10 loci que mostraron herencia mendeliana, y un

promedio de 15.8 alelos por locus, un valor promedio de H_E de 0.84 y H_O de 0.73. La probabilidad de exclusión de paternidad (la compatibilidad de la composición genética de un descendiente con la de los padres hipotéticos) fue muy alta de 99.99% para el total de loci, es decir, de cada 100 falsos padres que se analizaron solo un caso se tomaría como si fuera compatible, es decir, un padre verdadero.

Lowe *et al.* (2003) reportaron estudios de variación y estructura genética de *S. macrophylla* mediante AFLPs y SSRn. El estudio se realizó en la región norte de Costa Rica. Se identificaron 18 alelos, con la mayor diversidad genética representada dentro de las poblaciones (61.7%), y con un 38.3% de la variación genética entre poblaciones, por lo que obtuvieron un valor promedio de diferenciación genética alta (F_{ST}= 0.383; $P < 0.001$). Estos autores sugieren que esta estructuración genética tan marcada se puede deber a una dispersión limitada de las semillas o polen, por efecto de la variación ambiental que existe en los diferentes parches o fragmentos estudiados.

Céspedes *et al.* (2003) realizaron un estudio de variación y diferenciación genética en *S. macrophylla* inferidas con SSRn en el Parque Nacional de Santa Rosa, en el noroeste de Costa Rica. El estudio reportó de 14 a 20 alelos, heterocigosis esperada (H_E) de 0.47-0.54, y poca estructura genética (F_{ST}= 0.063), alto flujo genético (Nm = 3.71) entre los sitios y un índice de endogamia bajo (F_{IS}= 0.015).

Otro estudio realizado en *S. macrophylla* es el de Lemes *et al.* (2003), quienes analizaron la variación y estructura genética con SSRn en la parte baja de la selva de la Amazonía en Brasil. Obtuvieron en promedio 18 alelos por locus; niveles de variación genética (H_E) de 0.781 y estructura genética (F_{ST}) de 0.097, lo cual sugiere una moderada diferenciación genética entre las poblaciones. Estos resultados sugieren que debido a las condiciones geográficas de distribución continua de estas poblaciones y a las escasas barreras topográficas existentes entre ellas, existe un alto flujo genético. Además, sugieren que durante el Pleistoceno las condiciones climáticas en estas selvas fueron estables manteniendo la diversidad.

Novick *et al.* (2003), identificaron la variación y estructura genética de *S. macrophylla* inferidas por SSRn, en regiones de Mesoamérica. Reportan 13 alelos, un promedio de variación genética (H_E) de 0.66. En particular para la localidad de Nueva Becal, Campeche, en México, se obtuvo un valor de H_E alto (0.681) en comparación con poblaciones centroamericanas donde el valor fue menor (H_E= 0.559). La estructura genética fue moderada entre las poblaciones θ= 0.109, y el coeficiente de endogamia (f= 0.149) fue alto. Los autores sugieren que estos resultados indican una considerable variación genética dentro de las poblaciones y una moderada diferenciación genética, debido a la

biogeografía de la región, los agentes polinizadores y los diversos mecanismos de dispersión.

1.1.7. LA BIOLOGÍA DE LA CONSERVACIÓN

Para la conservación de *Swietenia macrophylla* es necesario tener conocimiento de los factores que permitan su manejo sostenible, como todas sus interrelaciones entre especies vegetales, animales y el ambiente en el cual se desarrollan, así como resaltar sus características de adaptación, variabilidad, y principalmente factores que están involucrados en la biología reproductiva de la especie, esto con la finalidad de hacer posible su regeneración, adaptación y variabilidad. La conservación *in situ* y *ex situ* involucra la conservación tanto de comunidades naturales, como de especies de interés, tomando en cuenta principalmente la diversidad genética que contienen.

De manera más específica, es importante desarrollar estrategias adecuadas de manejo de recursos genéticos de la caoba en el contexto de la biología (ecología de la regeneración) y de las presiones comerciales sobre la especie. La conservación debería de implicar la preservación de germoplasma a través de los árboles plantados, así como estrategias de recolección de semillas para el establecimiento *ex situ* de los bancos de semillas que deben de seguir el mismo principio para la conservación *in situ* (Lemes *et al.*, 2003).

Es fundamental tomar en cuenta que la caoba tiene pobre germinación de semillas y no tiene un adecuado establecimiento de plantas de semillero dentro de selvas tanto naturales como con disturbios, posiblemente debido a la carencia de luz y al sobre traslape con otros árboles (Navarro, 1999). Las mejores condiciones para el establecimiento de plantas de semillero de caoba están en grandes bloques desforestados, condiciones de apertura, por ejemplo después de huracanes o incendios forestales, por lo que las semillas pueden ser dispersadas a grandes distancias de los árboles a los alrededores de la selva. Se argumenta que la caoba ha evolucionado para ser adaptada para regenerarse y propagarse bajo tales condiciones de hábitat dinámicos dentro del arrase de los huracanes en las selvas de Centroamérica (Lowe *et al.* 2003).

Es importante conservar áreas protegidas y conocer la diversidad genética que poseen, de igual forma estudiar las poblaciones no protegidas para determinar si hay acervos genéticos que deban ser conservados y asegurar el mantenimiento de estos sitios de conservación (Navarro, 1999).

2. Hipótesis

Las poblaciones naturales de *Swietenia macrophylla* King de la Península de Yucatán y Sur de Veracruz presentan niveles bajos de variación genética y fuerte diferenciación genética debido a la deforestación y tala selectiva.

3. Objetivos

3.1. OBJETIVO GENERAL:

Generar información sobre la variación genética intra e interpoblacional, el tamaño efectivo y las rutas del flujo genético de las poblaciones de *Swietenia macrophylla* en la Península de Yucatán y Sur de Veracruz, México.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Analizar los niveles de variación y estructura genética de las poblaciones de *Swietenia macrophylla* en la Península de Yucatán y Sur de Veracruz.

Realizar estimaciones del flujo genético y su relación con la distribución geográfica de la especie.

Determinar el tamaño efectivo y las relaciones genéticas de las poblaciones en estudio.

4. Materiales y Métodos

4.1. SITIOS DE COLECTA

Los sitios de colecta de *S. macrophylla*, se seleccionaron de acuerdo a Pennington y Sarukan (1968) y Argüelles (1999) para la Península de Yucatán y comunidades de Veracruz, con base en la accesibilidad y la representación regional de la especie. Se seleccionaron 7 localidades; 3 en el estado de Quintana Roo: Punta Laguna (selva mediana subcaducifolia), El Ejido Caobas (selva alta perennifolia) y, Pioneros (selva mediana subcaducifolia); 3 en el estado de Campeche: Nueva Becal (selva alta perennifolia), El Tormento (selva alta perennifolia) y El Remate (selva mediana subcaducifolia); y 1 en el Sur de Veracruz (Sayula de Alemán con selva mediana subcaducifolia). Se tomaron datos de la ubicación geográfica de las poblaciones con el uso de un GPS, con el que se generó un mapa de distribución de las poblaciones de estudio (Figura 1).

Cuadro 2. Coordenadas geográficas de las poblaciones muestreadas de *Swietenia macrophylla* King

Estado	Población	Latitud (N)	Longitud (O)	Altitud
Campeche	El Remate (RE4)	20°32'6.00"N	90°22'23.00"O	8 m
Campeche	El Tormento (TOR5)	18°36'24.00"N	90°45'55.00"O	88 m
Campeche	Nueva Becal (NB7)	18°37'41.00"N	89°12'33.00"O	232 m
Quintana Roo	Punta Laguna (PL2)	20°30'54.00"N	87°42'51.00"O	18 m
Quintana Roo	Ejido Caobas (CA1)	18°18'0.00"N	89°20'60.00"O	251 m
Quintana Roo	Pioneros (PIO3)	17°53'5.00"N	89°10'44.00"O	71 m
Veracruz	Sayula de Alemán (SAY6)	17°52'52.44"N	94°57'0.69"O	70 m

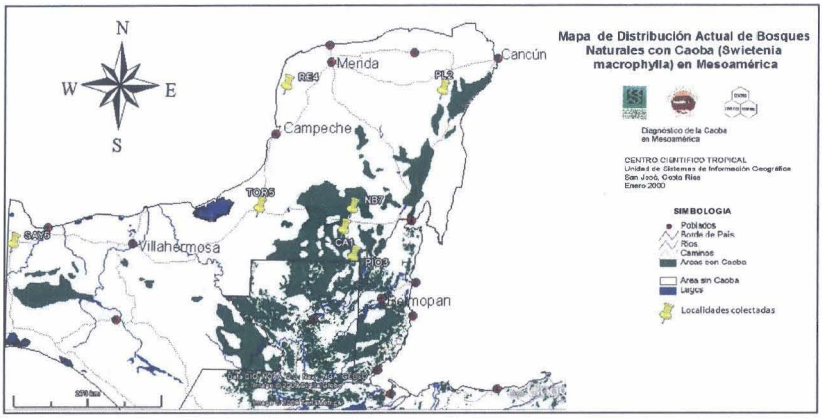

Figura 3. Ubicación geográfica de las poblaciones naturales de *S. macrophylla* King en estudio, distribuidas en la Península de Yucatán y Sur de Veracruz.

4.2. TRABAJO DE CAMPO

El material biológico que se colectó fueron hojas y raíces. Se colectaron hojas en las localidades que fue accesible obtenerlas y raíces en localidades en donde no se tuvo acceso a las ramas. Todo el material se colectó de árboles adultos con una distancia mínima entre árboles de 100 m. El tamaño de muestra colectado fue de 15 a 20 individuos por población dependiendo del tamaño censal de las poblaciones. El material, hojas y raíces, se colocó en neveras con hielo para su traslado al laboratorio, se lavaron con alcohol al 70% y agua destilada, luego se secaron y colocaron en bolsas de plástico debidamente etiquetadas para almacenarlas a -80° C para su posterior utilización en la extracción de ADN.

4.3. EXTRACCIÓN DE ADN

El ADN total fue extraído de raíces y hojas de acuerdo a la técnica de extracción Mini-prep CTAB modificado por Vázquez-Lobo (1996). Debido a los compuestos químicos (como polisacáridos), particularmente de las raíces, se requirió tratar las muestras en el buffer CTAB 2X (Tris-HCl 100mM pH 8, NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM, CTAB 2% y b-ME 0.3%) por 5 días, con la finalidad de que los componentes del buffer lograran actuar, romper y desintegrar los compuestos de las raíces (polisacáridos y proteínas) y liberar el ADN. Aproximadamente un gramo de hojas y/o raíces se molieron en un mortero, con nitrógeno líquido hasta pulverizarlo, y seguidamente se adicionó 1.5 ml de buffer CTAB 2X para continuar moliendo y asegurar que se rompieran las

paredes celulares y extraer el ADN contenido. Esta solución se recuperó en un tubo eppendorf de 1.5 ml para centrifugarlo a 10 000 rpm durante 8 min a 15 ºC. Luego se eliminó el sobrenadante y se le adicionó por segunda vez 500 ml de buffer de CTAB 2X y se homogeneizó para una mejor reacción en toda la muestra. El siguiente paso consistió en colocar las muestras en baño María a 60 ºC durante 10 min, posteriormente se les agregó cloroformo: octanol 24:1 e igualmente se homogeneizó para centrifugarlas a 7 000 rpm durante 15 min a 15 ºC hasta que el sobrenadante quedara transparente, repitiendo las veces que fuera necesario Posteriormente, se trasladó el sobrenadante a tubos eppendorf nuevos y se precipitó con 500 ml de isopropanol frío y se dejó reposar de 12 a 30 h a -20 ºC, es decir hasta el siguiente día. El siguiente paso fue centrifugarlo a 9 000 rpm durante 5 min a 15 ºC y luego se eliminó el sobrenadante, conservando el pellet (donde está el ADN), y se le adicionó 1 ml de etanol frío al 70% para limpiar el pellet y se centrifugó a 7 000 rpm durante 5 min a 15 ºC. A continuación, se eliminó el sobrenadante conservando el pellet y se colocó a secar hasta que se evaporó todo el alcohol, aprox. 2:30 h en una campana de flujo laminar. Por último, se resuspendió con 200 *µl* de agua y luego se colocó a -20 ºC, uno o dos días para que se disolviera.

4.4. CUANTIFICACIÓN DEL ADN

El ADN se cuantificó mediante un espectrofotómetro (Spectrophotometer Beckman). Se tomaron 2 *µl* de muestra y se diluyeron en 1000 ml de agua destilada estéril, se homogeneizó ligeramente y se midió en lecturas de longitud de onda de 260 *nm* para determinar la concentración de ADN en las muestras.
Se utilizó la siguiente fórmula para calcular la concentración de ADN:

$$\text{Concentración del ADN } (\mu g/\mu l) = \frac{OD_{260} \times (\text{factor de dilución}) \times 50\ \mu g/ml}{1000}$$

OD_{260}: densidad óptica a 260 nm
Factor de dilución: 250
El valor obtenido se multiplicó por 1000 y se obtuvieron las unidades en ng/µl. Posteriormente se ajustó con la concentración para 20 ng/µl, mediante la siguiente fórmula:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2 \qquad V_1 = \frac{C_2 V_2}{C_1}$$

4.5. MARCADORES MOLECULARES: MICROSATÉLITES NUCLEARES (SSRn)

En este estudio se seleccionaron 5 microsatélites polimórficos, uno desarrollado por Lemes *et al.* (2002): sm01 y, cuatro por White and Powell (1997): mac83, mac49, mac52 y mac59 (Cuadro 3). Los microsatélites seleccionados son tanto simples (un solo motivo repetido *n* veces en serie) como compuestos (dos o más motivos repetidos en serie), y están conformados por mononucleótidos, dinucleotidos y trinucléotidos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Secuencias de oligonucleótidos, motivos repetidos, número de alelos, y tamaño de fragmentos para cinco microsatélites (Lemes *et al.*, 2002; White and Powell, 1997).

Locus	Secuencia repetida	Secuencia de primer (5'-3')	Tamaño de los fragmentos (bp)
mac49	(GT)27	AGGGTCTTTGTTGATGAATACC ATCATCGCCGTTGATACATT	105–151
mac52	(A)10 (AC)11	GCGATGAATGTTGTACACCG AGCAGCCCGGTACTAGCATGT	234-252
mac59	(AAT)5 (CAT)3	TGGAGTAAAGTCGAGGGCTG GGCTGGATATGGCACTTGTT	197-212
mac83	(CT)10 (AC)14	CCTGAAAGCTTAATGGCCAC TCAGCCTTTGAGGGATGAAC	165-175
Sm01	(AG)19	GCGCGATTGATTGACTTC GCGCTTAGCATTATTCTCC	261-295

4.6. AMPLIFICACIÓN MEDIANTE PCR

La PCR se utilizó para amplificar a los microsatélites. Se preparó una mezcla de reacción para la PCR (Mix) de 20 µl, cuyos componentes fueron: 3.3 µl de buffer de PCR 10X (200 mM Tris –HCl, pH 8.4, 500 mM KCl; Invitrogen), 1.6 µl de 0.2 mM dNTPs, Invitrogen; 0.8 µl de 10 µM de la solución de los primers forward y reverse; 10.55 µl de agua destilada fría estéril; 0.75 µl de 50 mM de $MgCl_2$, Invitrogen; 0.2 µl de 5 U Taq de ADN polimerasa; y 2 µl de 20 ng de ADN para un volumen final de 20 µl de la Mix o reacción. Las condiciones de PCR para todos los oligos fueron: la desnaturalización a 94 °C por 5 min, seguidamente 45 ciclos de 5 s a 94 °C, alineamiento de 10 segundos a 55 °C y 35 s a 72 °C, y el paso de elongación final de 5 min a 72 °C (modificado de Céspedes *et al.*, 2003).

4.7. PRODUCTOS AMPLIFICADOS

Este paso únicamente se hiso para verificar la amplificación, en el cual los productos amplificados se visualizaron en geles de agarosa al 1% y se corrieron en cámaras de electroforesis horizontales (Horizon 11 14, Life Technologies). Para la preparación de estos geles, se utilizó 1g de agarosa diluida en 50 ml de buffer TBE 10X (0.89 M Tris, 0.89 M ácido bórico, 1 mM de EDTA), se colocó en el microondas por 1' 30''. Seguidamente se colocó en el molde y antes de que solidificara se le adicionaron 3 µl de bromuro de etidio. A continuación se colocó en la cámara de electroforesis y se cargaron 3 µl de las muestras de PCR mezcladas con 2 µl de colorante, vertidas en los pozos formados por los peines. Se corrió aprox. 17 min a 121 volts. Finalmente se observaron los fragmentos amplificados en un transiluminador de UV.

4.8. GELES DE POLIACRILAMIDA

La separación de los fragmentos amplificados se llevó a cabo por medio de geles de poliacrilamida al 6% (7 M Urea). Para esto se prepararon utilizando un cristal grande de 51 x 33 y uno pequeño de 46 x 33, estos fueron lavados con agua y detergente, luego con alcohol al 70% y en seguida con agua destilada, para finalmente dejarlos secar por aprox. 30 min. A continuación se le adicionó 1 ml de repelente (RAIN) al cristal grande con la ayuda de un papel (kleenex), se distribuyó de forma homogénea por una de sus caras, esto para que no se pegue al cristal pequeño. De forma similar se le agregó al cristal pequeño una solución de 3 µl de Bind Silane diluidos en 1ml de agua destilada para que se adhiera el gel de poliacrilamida, y por último se pusieron ambos cristales a secar, aprox. 30 min. Posteriormente al cristal grande se le acomodaron tres separadores, dos a los lados y uno abajo, y en seguida

se colocó encima el cristal pequeño, ya bien alineados en la orilla se le puso cinta aislante y pinzas para evitar la salida del gel antes de que polimerice.

Se agregó lentamente la acrilamida (75 ml de acrilamida al 6%, 290 µl de Persulfato de Amonio al 10%, y 90 µl de TEMED) verificando que no formara burbujas, y finalmente se dejó polimerizar aprox. 1 h. Posteriormente se le quitaron las pinzas, las cintas aislantes, el separador colocado abajo, y se lavó con agua para limpiar los residuos de acrilamida. Seguidamente se colocó en el equipo de electroforesis vertical llenado con buffer TBE 10X, previamente se realizó una corrida de 30 min con el peine colocado, y enseguida se fueron colocando 5 µl de muestras de PCR mezcladas con colorante, las cuales fueron previamente desnaturalizadas. Estas muestras fueron corridas con un marcador de 10 pb (10 pb ladder, Invitrogen), mediante las siguientes condiciones de corrida: 2500Volts, 0.42 Ampers y 54 Watts, y el tiempo de corrida fue de aprox. 2:30 h, determinado según el primer.

4.9. TINCIÓN CON NITRATO DE PLATA

La visualización de los fragmentos se hizo por medio de la técnica de tinción con nitrato de plata. Para esto al término de la corrida se quitaron los cristales de la cámara de electroforesis y se limpiaron de cualquier residuo con agua destilada, enseguida se despegaron los dos cristales e inmediatamente el cristal pequeño que contenía al gel, fue colocado en ácido acético al 10 % frío durante 20 min en agitación 90 rpm. Posteriormente recibió tres lavados con agua destilada fría (2 min cada lavado), y seguidamente se colocó en la solución de nitrato de plata fría más formaldehido al 37% durante 30 min en agitación 90 rpm, posteriormente se lavó en agua destilada fría por aprox. 5 segundos, para finalmente colocarlo en una solución de carbonato de sodio más formaldehido al 37 % fría para revelarlo, el cual consistió primero en agregarle la mitad de esta solución y lavarlo hasta que empiecen aparecer las bandas, enseguida se desecha y se le adiciona la otra mitad de dicha solución para terminar de teñirlo. Para detener la tinción se le agregó ácido acético al 10% dejándolo por 3 min, y por último se deja en agua destilada fría por aprox. 15 min (modificado de Echt *et al.*, 1998).

4.10. LECTURA DE DATOS

En los geles de poliacrilamida se observaron diferentes bandas dentro del tamaño esperado del microsatélite, se identificó como homócigos al individuo que presentaba una banda y como heterócigos al individuo que presentaba dos bandas. Los individuos homócigos muestran un

alelo idéntico que viene de los padres. Los individuos heterócigos muestran dos alelos diferentes, cada uno de cada padre. Para leer estas bandas se utiliza un transiluminador de luz blanca, donde se busca determinar el tamaño de alelos observando el patrón de bandas mediante un marcador de 10 pb. Posteriormente se registraron los resultados en una matriz de datos.

4.11. FRECUENCIAS GENOTÍPICAS Y ALÉLICAS

Para estimar la variación genética se utilizaron las frecuencias genotípicas, las cuales son patrones de frecuencia de genotipos dados en una población debido por ejemplo al apareamiento al azar. También se utilizaron las frecuencias alélicas por locus único en una población, las cuales son la medida de la presencia de varios alelos dados en una población. Se calcularon las frecuencias alélicas de varios loci y de diferentes individuos o poblaciones, mediante el programa Arlequín 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005).

4.12. ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA Y ESTRUCTURA GENÉTICA

Los niveles de diversidad genética o variación genética intrapoblacional fueron calculados con el modelo de mutación de un solo paso (SMM), mediante los parámetros: el número de alelos por locus (A), alelos efectivos (Ae), diversidad genética (H), heterocigosis observada (H_O) y heterocigosis esperada (H_E) (Hartl and Clark, 1989), utilizando el Software de Arlequín 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005), y por último el tamaño efectivo (Ne) se calculó de acuerdo a la fórmula de Slatkin y Barton (1989): $Ne = 2\pi Nm$.

La estructura genética entre poblaciones fue estimada mediante los estadísticos de F de Wright (1978): el índice de endogamia (F_{IS}), la diferenciación genética (F_{ST}) y la diferenciación genética total (F_{IT}), a través de un análisis jerárquico de varianza molecular (AMOVA, Excoffier *et al.*, 2005). Estos estadísticos se calcularon tanto con el modelo de alelos infinitos IAM (F_{ST}) (Kimura y Crow, 1964) como con el modelo de mutaciones de un paso SMM (RST) (Otha y kimura, 1973) desarrollado para microsatélites. El flujo genético (Nm) se estimó indirectamente a partir de la F_{ST} siguiendo la fórmula $Nm = 1/4\ (1/\ F_{ST} - 1)$ (Crow y Aoki, 1984). Para la obtención de los parámetros y estadísticos estimados se usó el programa Arlequín 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005).

4.13. RELACIONES GENÉTICAS

Se construyó un filograma (UPGMA; Análisis Jerárquico de Conglomerados) con base en las distancias genéticas de Golstein ($\delta\mu^2$), basadas en el modelo de mutaciones de un paso (SMM; Golstein *et al.,* 1995). La robustez de la topología fue evaluada con el algoritmo de remuestreos bootstrap, con un total de 1000 replicaciones (Felsenstein, 1985). El análisis y la reconstrucción del filograma se realizó con el programa Poptrdos.exe conocido como NJBAFD (Takezaki, 2001).

4.14. PATRONES DE AISLAMIENTO POR DISTANCIA

Para el análisis de aislamiento por distancia (relación entre las distancias geográficas y genéticas) se realizó una prueba de Mantel (Mantel, 1967) con 1000 permutaciones usando los programas TFPGA (Miller, 1997) y Arlequín 3.1 (Excoffier *et al.,* 2005).

5. Resultados

5.1. RIQUEZA ALÉLICA

Se presentaron de dos a 10 alelos por locus y entre 16 y 21 alelos por población con un total de 28 alelos (Cuadro 4 y 5). Se observó más de un alelo en cada locus examinado, y la mayoría de los alelos se presentaron en más de una población (Cuadro 4). Además todos los alelos presentaron frecuencias más altas al 3%.

Para el *locus* mac83 se encontraron cinco alelos que no habían sido reportados para la especie (161,177, 179,181 y 187) y para *el locus* sm01 solo se encontró un nuevo alelo (258) (Figura 4, 5 y 6).

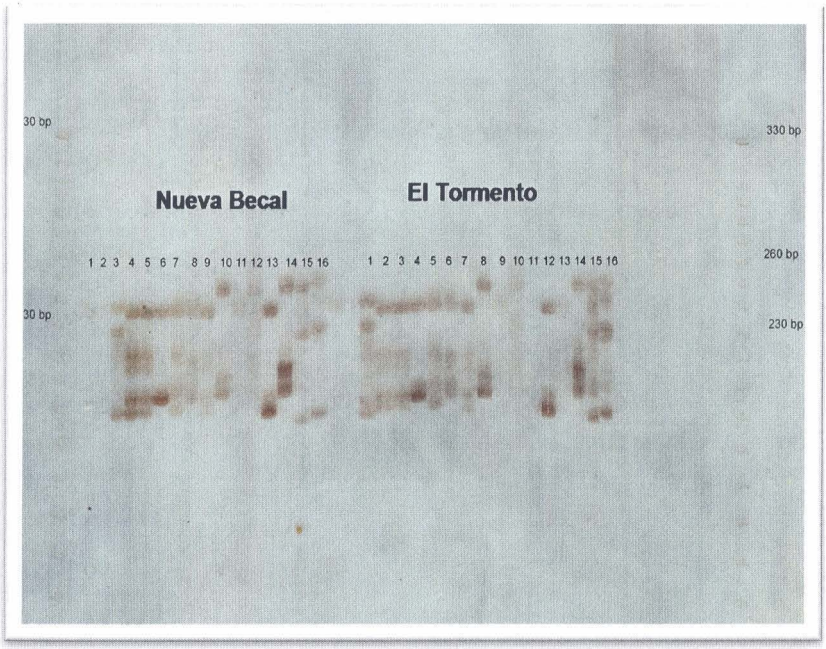

Figura 4. Gel de poliacrilamida con los patrones de bandas de las poblaciones de Nueva Becal y el Tormento para el microsatélite mac52.

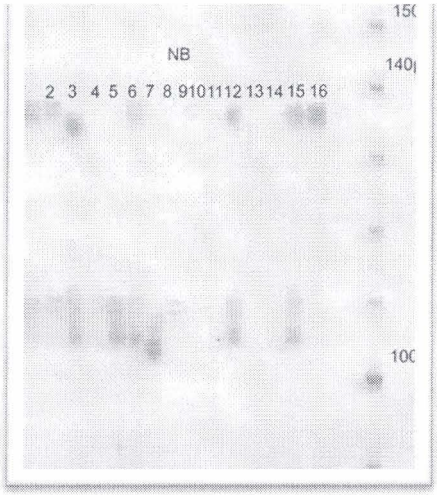

Figura 5. Gel de poliacrilamida con los patrones de bandas de la población de Nueva Becal para el microsatélite mac49.

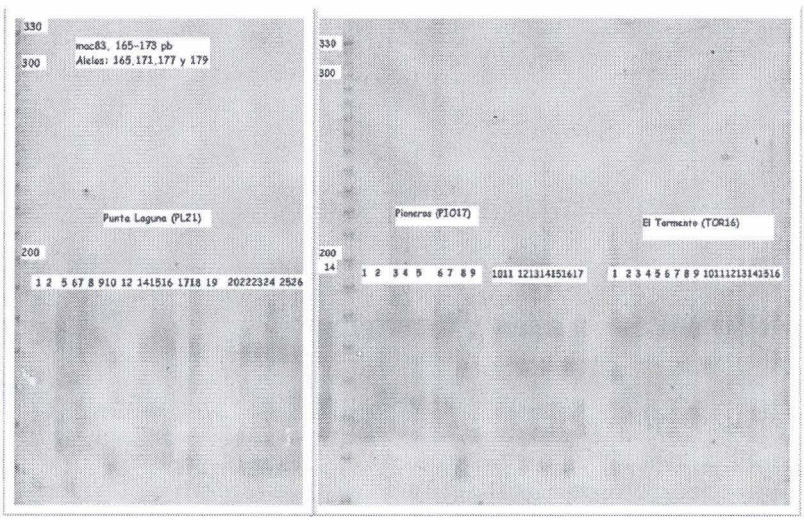

Figura 6. Gel de poliacrilamida con los patrones de bandas de las poblaciones de Punta Laguna, Pioneros y El Tormento para el microsatélite mac83.

Figura 7. Gel de poliacrilamida con los patrones de bandas de la población de Punta Laguna para el microsatélite sm01.

El promedio de alelos por locus (*A*) varió entre poblaciones de 3.4 a 4.4, con un promedio para los cinco loci de 3.82 (Cuadro 5). Sin embargo, la variación en el promedio del número de alelos efectivos (*Ae*) fue ligeramente más pequeño entre 2.4 y 3.1.

5.2. DIVERSIDAD GENÉTICA Y EQUILIBRIO DE HARDY WEINBERG

La diversidad genética varió ligeramente entre las poblaciones (Cuadro 5). El promedio de heterocigosis esperada (H_E) para todos los loci en las siete poblaciones fue de 0.482, el promedio de heterocigosis observada (H_O) de 0.341, (Cuadro 5).

El promedio de heterocigosis esperada (H_E) fue generalmente más alto que el promedio de heterocigosis observada (H_O), y solamente la población RE4 mostró un valor ligeramente mayor para ambos estimadores (Cuadro 5). Por tanto, el promedio de endogamia para todos los loci fue moderadamente alto (F_{IS}= 0.318) con niveles significativos (P> 0.005) (Cuadro 10). Estos resultados indican tendencia a una deficiencia de heterocigosis, lo que sugiere que en promedio las poblaciones presentan valores importantes de endogamia.

Cuadro 4. Frecuencias alélicas de cinco microsatélites para siete poblaciones de *Swietenia macrophylla* King de la Península de Yucatán y sur de Veracruz, México.

		Alelo (pb)	Frecuencias Poblaciones						
Locus 1	**mac49**		**CA1**	**PL2**	**PIO3**	**RE4**	**TOR5**	**SAY6**	**NB9**
	1	105	0.031	0.038	0.083	0.286	0.2		0.033
	2	107	0.031	0.038	0.125	0.036	0.367	0.273	0.033
	3	111	0.625	0.346	0.083	0.25		0.136	0.467
	4	113			0.042	0.036	0.033	0.045	
	5	131			0.042		0.033	0.045	
Locus 2	**mac52**								
	1	234		0.115					0.033
	2	236	0.344	0.615	0.208	0.179	0.533	0.455	0.6
	3	238	0.188				0.033		0.033
	4	248	0.188	0.192	0.5	0.071	0.033	0.227	0.2
	5	250	0.031		0.125	0.393	0.4	0.045	0.067
Locus 3	**mac83**		**CA1**	**PL2**	**PIO3**	**RE4**	**TOR5**	**SAY6**	**NB9**
	1	161				0.036			
	2	165	0.188	0.154	0.125	0.429	0.133	0.182	0.133
	3	177	0.594	0.615	0.542	0.5	0.533	0.818	0.733
	4	179	0.094				0.333		0.033
	5	181							0.1
	6	187				0.036			
Locus 4	**mac59**								
	1	218				0.036			
	2	221	0.75	0.615	1	0.964	1	1	0.933

Locus 5	sm01								
	1	258	0.031	0.115	0.042			0.045	0.033
	2	261	0.219	0.038		0.321	0.033	0.0455	0.2
	3	265		0.269			0.1		
	4	270				0.071	0.067	0.182	0.033
	5	272	0.531	0.308	0.542	0.286	0.367	0.318	0.5
	6	273		0.077				0.182	0.067
	7	277	0.063	0.038	0.083	0.286			
	8	279	0.094	0.077	0.125	0.036	0.133	0.227	0.033
	9	285	0.063	0.077	0.042		0.067		
	10	289					0.100		0.133

Cuadro 5. Diversidad genética de siete poblaciones de *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae).

Población	*n*	No. de alelos	*A*	*Ae*	H_O	H_E
CA1	16	17	3.6 (1.625)	2.930	0.255 (0.210)	0.473 (0.250)
PL2	13	17	3.6 (2.417)	3.022	0.167 (0.129)	0.455 (0.277)
PIO3	12	16	3.4 (1.855)	2.593	0.355 (0.282)	0.416 (0.231)
RE4	14	20	4.000 (1.414)	3.177	0.497 (0.255)	0.546 (0.250)
TOR5	15	21	4.4 (2.332)	3.063	0.294 (0.242)	0.551 (0.289)
SAY6	11	16	3.4 (1.855)	2.725	0.463 (0.321)	0.470 (0.288)
NB7	15	21	4.4 (1.960)	2.434	0.358 (0.265)	0.461 (0.245)
PRO-MEDIO TOTAL		18.286	3.829	2.849	0.341	0 .482

n, número de muestras; *A*, promedio de alelos por locus; *Ae*, alelos efectivos; H_O, heterocigosis observada; H_E hetorocigosis esperada; (en paréntesis la desviación estándar).

5.3. ESTRUCTURA GENÉTICA

El promedio de F_{ST} de 0.086, indica un nivel moderado de diferenciación genética entre las poblaciones, con un 8.6% de la variación distribuida entre poblaciones (Cuadro 6 y 7). El valor promedio de la diferenciación genética total fue alta (F_{IT} = 0.377, P< 0.05) (Cuadro 7).

Cuadro 6. Resultados de AMOVA para siete poblaciones de *Swietenia macrophylla* King

Fuente de variación	d.f.	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	6	27.134	0.117	8.641
Entre individuos dentro de poblaciones	89	130.461	0.393	29.059
Dentro de individuos	96	75.000	0.841	62.300
Total	191	232.596	1.351	

Cuadro 7. Estadísticos *F* de Wright, Flujo genético (*Nm*) estructura genética (F_{ST}) y tamaño efectivo (*Ne*) a partir de *Nm* de cinco loci polimórficos.

	Estadísticos				
	F_{IS}	F_{ST}	F_{IT}	*Nm*	*Ne*
PROMEDIO	0.318	0.086	0.377	2.657	16.694

Con respecto al flujo genético se obtuvieron valores superiores a un migrante por generación entre pares de poblaciones con un valor promedio de 2.657 (Cuadro 7 y 8). Estos resultados indican que el flujo génico entre las poblaciones es alto, y corroboran la poca diferenciación genética obtenida. El promedio del tamaño efectivo (*Ne*) de las poblaciones fue de 16.694 (Cuadro 7).

Cuadro 8. Flujo genético entre pares de poblaciones, *M* (*M*= *Nm*)

	CA1	PL2	PIO3	RE4	TOR5	SAY6	NB7
CA1							
PL2	6.34559						
PIO3	Inf	9.09971					
RE4	8.22767	4.21909	3.83451				
TOR5	18.73068	279.90467	18.67091	4.73086			
SAY6	6.55489	9.97272	10.25139	4.34567	54.43976		
NB7	inf	6.61234	47.93508	6.25865	38.63014	8.50263	

Inf= Infinito

5.4. AISLAMIENTO POR DISTANCIA

A pesar de que existe un valor de correlación importante entre las distancias geográficas y distancias genéticas entre pares de poblaciones, este no fue estadísticamente significativo (r= 0.341; P= 0.162; Figura 7), lo cual indica que la distribución de la variación genética no se asocia de manera importante con la distribución geográfica de las poblaciones de *S. macrophylla*.

5.5. RELACIONES GENÉTICAS

El análisis de UPGMA mostró un agrupamiento de acuerdo con la localización geográfica de las poblaciones, así CA1 y PL2 se agruparon a mayor distancia genética como representativas de la región de Quintana Roo. Sin embargo, la población de PIO3 que también se ubica en el estado de Quintana Roo se agrupó en la base del segundo grupo. Por lo que el segundo grupo está conformado por tres subgrupos, el primero incluye a la población de PIO3, el segundo a las poblaciones de NB7 y el TOR5 (Campeche) y el tercer subgrupo incluye a las poblaciones SAY6 y el RE4 que se ubican en la región del Golfo de México (Figura 8.).

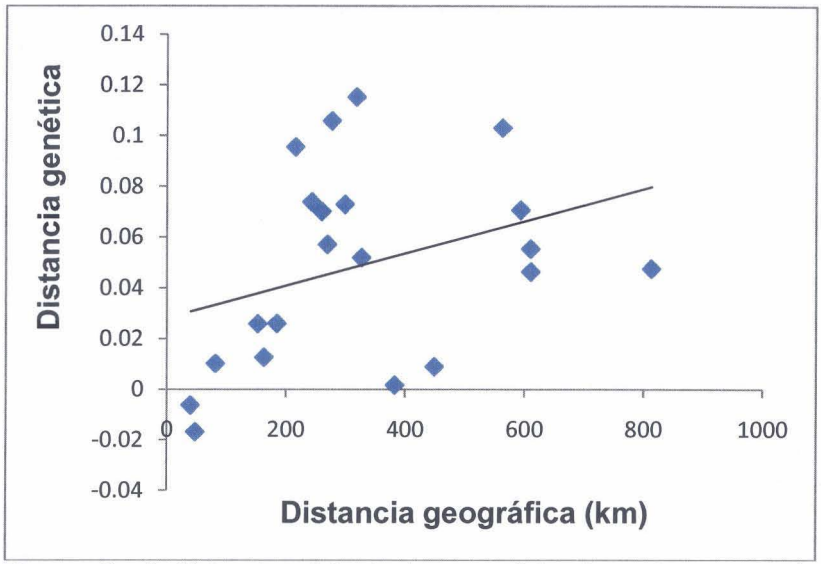

Figura 8. Análisis de aislamiento por distancia entre pares de poblaciones de *Swietenia macrophylla* King estudiadas.

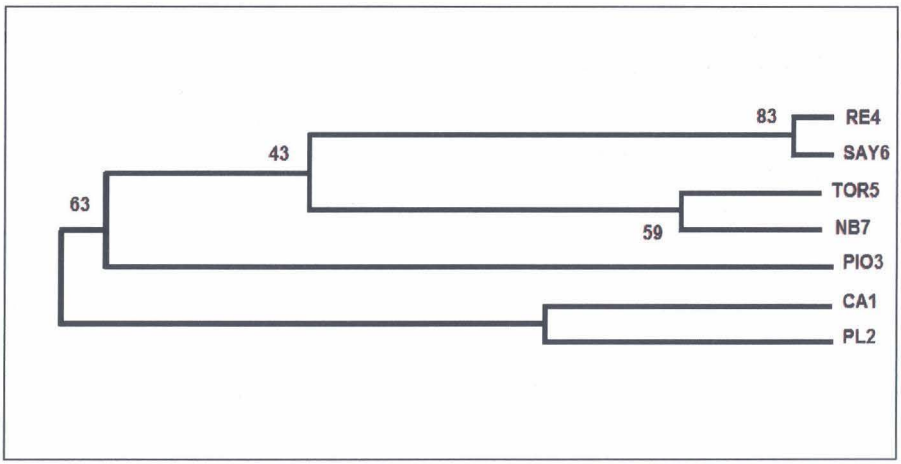

Figura 9. Relaciones genéticas de las poblaciones de S. macrophylla, obtenidas con las distancias genéticas de Golstein ($\delta\mu^2$), con base al método de UPGMA. Los números son los valores de Bootstrap basados en 1000 replicaciones (Felsenstein, 1985).

6. Discusión

6.1. VARIACIÓN Y ESTRUCTURA GENÉTICA

El estudio demostró que las poblaciones de *Swietenia macrophylla* distribuidas en la Península de Yucatán y sur de Veracruz contienen niveles de variación genética relativamente bajos (H_E= 0.482) en comparación con otras poblaciones estudiadas en la Amazonía (H_E= 0.781, Lemes *et al.*, 2003, H_E= 0.84; Lemes *et al.*, 2002) y Mesoamérica (H_E= 0.657; Roth-Novick *et al.* 2003). Sin embargo, estudios reportados por Gillies *et al.* (1999) en Mesoamérica (H_E= 0.450) y Céspedes *et al.* (2003) en Costa Rica (H_E= 0.470-0.540) reportan valores similares (ver Cuadro 11). Las poblaciones que presentaron la mayor diversidad genética fueron TOR5 (H_E= 0.551) y RE4 (H_E= 0.546), ubicadas en el estado de Campeche. Posiblemente esta alta diversidad genética se ha mantenido porque las poblaciones todavía se ubican dentro de fragmentos de selvas que no han sido intensamente desforestados, cuentan con la protección y regulación de un buen manejo forestal (SEMARNAT, 2006). En contraste, las poblaciones menos diversas genéticamente fueron PIO3 (H_E= 0.416) y PL2 (H_E= 0.455) del estado de Quintana Roo. La población de PIO3 se ubica geográficamente entre las regiones Silvituc-Calakmul y Río Hondo, las cuales son regiones establecidas para la conservación de la biodiversidad (SEMARNAT, 2006). A pesar de que PIO3 se localiza en una zona conservada en bajos inundables, es una población con escasos individuos (representadas por aprox. 10 individuos en 2, 500 m^2), y está delimita con la región de mayor actividad forestal ejidal, específicamente en Felipe Carrillo Puerto y Othón P. Blanco conocido como Pioneros donde se realiza el 78% del manejo forestal del estado Quintana Roo (SEMARNAT, 2006). La población de PL2 por su parte, se encuentra en un área perturbada y se distribuye en la zona más norteña y aislada de la especie en el estado de Quintana Roo, y está también conformada por escasos individuos. Estas características ecológicas del hábitat en donde se distribuyen estas dos poblaciones podrían estar asociadas a la pérdida de diversidad genética que presentan.

En cuanto a los niveles de endogamia, estos fueron altos (F_{IS}= 0.318), superiores a los reportados por Novick *et al.* (2003) para Mesoamérica (F_{IS}= 0.149). White *et al.* (1999) indican que el tamaño pequeño de las poblaciones y su fragmentación están asociados a la pérdida de diversidad genética (específicamente la pérdida de alelos de menor frecuencia), lo cual aumenta el déficit de heterocigosis con el consecuente aumento de los niveles de endogamia. Lemes (2000) y Lowe *et al.* (2003) señalan que estos niveles de endogamia también se pueden deber a que los árboles de una población tienden a florecer simultáneamente. Asimismo, y con relación al manejo forestal, Lowe *et*

al. (2003) recomienda estudios más detallados sobre la intensidad de la extracción para predecir comparaciones entre la intensidad de los disturbios y los niveles de diversidad (pre y postimpacto). Finalmente, los análisis de SSRn indican que en la mayoría de las poblaciones de *S. macrophylla* distribuidas en México, la diversidad genética se encuentra dentro de las poblaciones (62.3%), y presentan una moderada estructura genética (F_{ST}= 0.086). Este resultado es similar al que reporta Lemes *et al.* (2002) para las poblaciones de la Amazonía (F_{ST}= 0.097), y diferente a Novick *et al.* (2003), para algunas localidades de Mesoamérica, en donde la estructura genética fue moderada entre las poblaciones (F_{ST}= 0.109) (Cuadro 9). En general, se infiere que la pérdida de diversidad genética se puede deber a barreras geográficas históricas, las cuales han aislado las poblaciones originando procesos de endogamia y de deriva génica. Lo anterior, aunado a la destrucción de las selvas por huracanes, incendios y por la deforestación excesiva que se ha presentado en esta región (Argüelles, 1999).

6.2. FLUJO GENÉTICO Y AISLAMIENTO POR DISTANCIA

El flujo genético en promedio fue alto (*Nm* = 2.657), lo cual está relacionado con la baja diferenciación genética encontrada entre las poblaciones. White and Powell (1997) suponen que las condiciones de mucho viento incrementan el flujo de genes entre poblaciones fragmentadas y aisladas de esta especie, ya que los agentes polinizadores (insectos, abejas, trips y polillas) no pueden hacerlo porque vuelan a distancias cortas y necesitan de bloques grandes de selva con dosel continuo. Probablemente este también es el caso para la Península de Yucatán, ya que las pocas selvas están fragmentadas debido a la tala selectiva. Gilles *et al.* (1999), también sugieren que al aumentar la distancia geográfica frecuentemente resulta en un incremento en el aislamiento entre las poblaciones y por tanto reduce el flujo genético, pero de igual forma puede ocurrir que haya un considerable flujo de genes que esté dando una homogeneidad genética espacial dentro de un área. Para este estudio no se presentó un patrón de aislamiento por distancia significativo, por lo que de acuerdo a Gillies *et al.* (1999), se presenta una homogeneidad genética entre las poblaciones.

6.3. RELACIONES GENÉTICAS

A pesar de que en este estudio no se presentó un patrón de aislamiento por distancia de manera significativa, si se observa una relación importante de las relaciones genéticas de las poblaciones con su distribución geográfica: La población de CA1 y la de PL2 forman un primer grupo claramente definido, las cuales se distribuyen en el estado

de Quintana Roo, presentan niveles intermedios de variación genética y comparten el mayor número de alelos.

Cuadro 9. Estudios de estructura y variación genética de *Swietenia macrophylla* inferidas con SSRn, AFLP's y RAPD's.

Localidad/ Región	*A*	*Ho*	H_E	F_{IS}	R_{ST}/F_{ST}	*Nm*	Referencia
Costa Rica	20	0.450-0.580	0.470-0.540	0.015	0.063	3.710	Céspedes *et al.* (2003)
Sur del Amazonas	18.4	0.750	0.781	0.132	0.097	-	Lemes *et al.* (2003)
Costa Rica	-	0.335	0.447	0.24	0.383	0.791	Lowe *et al.* (2003)
Mesoamérica	13	0.559	0.657	0.149	0.109	-	Roth-Novick *et al.* (2003)
Sur del Amazonas	15.8	0.730	0.840	-	-	-	Lemes *et al.* (2002)
Mesoamérica	-	-	0.450	-	-	-	Gillies *et al.* (1999)
Honduras	7.1	0.472-0.490	0.548	0.223	-	8.9	White *et al.* (1999)
Honduras	9.7	0.415	0.546	0.217	0.036	4.926	White and Powell (1997)
Sureste de México	3.8	0.341	0 .482	0.318	0.086	2.657	Presente estudio

A, promedio de número de alelos por locus; *Ae*, alelos efectivos; H_O, heterocigosis observada; H_E, hetorocigosis esperada, F_{IS}, endogamia; R_{ST}/F_{ST}, diferenciación genética; *Nm*, flujo genético.

El segundo grupo está conformado por tres subgrupos; en la base se encuentra el primer subgrupo representado por la población de PIO3 distribuida en Quintana Roo. Esta población es la que presentó los más bajos niveles de diversidad genética (H_E= 0.416), pero comparte alelos con el resto de las poblaciones. El segundo subgrupo conformado por las poblaciones de TOR5 y NB7 distribuidas en el estado de Campeche y el tercer subgrupo incluye a las poblaciones de RE4 y SAY6 que se ubican en la región del Golfo de México. No obstante que la mayor diversidad genética se encuentra representada en las poblaciones de RE4 y TOR5, estas comparten más alelos con las poblaciones de SAY6

y NB7 respectivamente, por lo que su asociación genética se debe más a la distribución geográfica de las poblaciones que a la cantidad de variación genética encontrada. Las poblaciones de TOR5 y NB7 (con aprox. 10 individuos en 1, 250 m^2) se ubican en la región protegida de Silvituc-Calakmul (20,475 km^2), esta región incluye a una de las mayores extensiones de selvas tropicales del país, así como parte de la selva maya en México (CONABIO, 2008), la cual contiene a las selvas tropicales y subtropicales casi intactas. La población de RE4 se encuentra localizada en la región protegida de los Petenes en Ría Celestun (2,113 km^2), en los Petenes 282 858 ha, y en Ría Celestún 81 482 ha (INEGI 2007). Como es una de las poblaciones que en el filograma se ubica en una de las ramas de más reciente origen, podemos inferir que las variantes alélicas que la conforman junto con la localidad de SAY6 (Veracruz), probablemente sean de un origen reciente, por lo que estas poblaciones fragmentadas y con tamaños poblacionales pequeños probablemente se encuentren en proceso de expansión o colonización. En contraste, el primer subgrupo (PIO3) que de acuerdo con la topología del filograma obtenido, es el que se encuentra en la parte más basal, indica que pudo haber divergido más atrás en el tiempo. Entonces es posible que las poblaciones que contienen las variantes alélicas más ancestrales sean las poblaciones de PIO3, CA1 y PL2 distribuidas en el estado de Quintana Roo, a partir de las cuales se dio la dispersión a la parte norte de Mesoamérica.

6.4. RECOMENDACIONES PARA LA CONSERVACIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio ilustran la importancia que la genética de poblaciones tiene para la conservación de estas poblaciones. Uno de los parámetros de mayor importancia que se utilizan como criterios de selección de poblaciones para la conservación es el tamaño efectivo de las poblaciones (*Ne*), el cual para este estudio en promedio fue de 16.694. Aunque en la literatura no se reportan estimaciones del *Ne* de otras poblaciones de *S. macrophylla,* se ha considerado que el tamaño efectivo de las poblaciones en Mesoamérica es más pequeño que el de las poblaciones de Sudamérica, debido fundamentalmente al efecto que las glaciaciones del Pleistoceno tuvieron sobre esta región (Novick *et al.* 2003). Estos eventos pudieron haber influido en la fragmentación y en el asilamiento geográfico de las poblaciones que actualmente observamos. Por tanto, las poblaciones que se consideran prioritarias para su conservación son: PIO3, que es la población que contiene la menor diversidad genética, pero es la de mayor importancia desde el punto de vista filogenético, al ser la población más basal u ancestral. Las poblaciones RE4 y TOR5 que contienen los niveles más altos de heterocigosis y la mayor diversidad alélica, por lo que pueden ser poblaciones representativas del pool genético de *S. macrophylla* para México.

7. Conclusiones

Se encontraron niveles de variación genética relativamente menores a las obtenidas en otras poblaciones de Centroamérica, y las poblaciones de mayor diversidad genética son las que se distribuyen en reservas o zonas con un adecuado manejo forestal. Esto indica que la pérdida de diversidad genética podría estar fuertemente influenciada por la deforestación, incendios o huracanes.

Se presentó una asociación importante entre la distancia genética y la distancia geográfica aunque no fue significativa estadísticamente.

El flujo genético de las poblaciones fue alto, por lo que la estructura genética fue baja. Los altos niveles de *Nm* obtenidos, posiblemente están asociado con la dispersión de polen por el viento.

Las relaciones genéticas encontradas apoyan la hipótesis de que las poblaciones mexicanas se originaron de Mesoamérica, presentándose los alelos ancestrales en la región más sureña de México (Quintana Roo), y los alelos más recientes en las poblaciones distribuidas más al norte de México (Campeche).

Las poblaciones prioritarias para su conservación son, PIO3 (Quintana Roo) que es la que presentó los menores niveles de variación genética, y las poblaciones TOR5 y RE4, con los mayores niveles de diversidad genética, las cuales pueden ser poblaciones representativas del pool genético de *S. macrophylla* King en México.

8. Perspectivas

La información generada en este estudio es de gran importancia por la generación de conocimiento sobre la diversidad genética y de conservación de la caoba en la Península de Yucatán y Sur de Veracruz. Estos datos permiten generar nuevos programas orientados a designar áreas importantes para la conservación de las poblaciones naturales de caoba, de igual forma se podrá recolectar y seleccionar germoplasma de alta calidad genética para planes de reforestación o para incrementar su valor comercial. Asimismo, estos datos se pueden comparar a otras especies similares de árboles tropicales.

Para que las bases genéticas y planes de conservación de la caoba sean más sólidas, se podrían incluir más poblaciones naturales del Sur de México y utilizar otros marcadores moleculares que nos proporcionen más información sobre la variación genética de este importante recurso maderable.

9. Literatura citada

Argüelles, A. 1999. Diagnóstico de la caoba (*Swietenia macrophylla* King) en Mesoamérica, México. Centro Científico Tropical, USAID. 80 p.

Azofeifa-Delgado, A. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. Agronomía Mesoamericana, 17(2): 221-242.

Bauer, G. P. and J. K. Francis. 1998. *Swietenia macrophylla* King Honduras mahogany, caoba. SO-ITF-SM-81. New Orleans, LA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station. pp. 492-498.

Brown, A. H. D., O. H. Frankel, D. R. Marshall and J. T. Williams. 1989. The use of plants genetic resources. Cambridge University Press. New York, USA. 382 p.

Calvo, J. 2000. Diagnóstico de la Caoba (*Swietenia macrophyla* King) en Mesoamérica. Visión general. San José, CR, Centro Científico Tropical. 21 p.

Céspedes, M., M. V. Gutiérrez, N. M. Holbrook and O. J. Rocha. 2003. Restoration of genetic diversity in the dry forest tree *Swietenia macrophylla* (Meliaceae) after pasture abandonment in Costa Rica. Molecular Ecology, 12: 3201-3212.

CITES, 2002. Convention on International Trade in Endangered Species, Appendix II.

CONABIO, 2008. Regiones prioritarias terrestres. Web (www.conabio.gob.mx).

SARH, Inventario nacional forestal periódico. 1992-1994. Subsecretaría Forestal y de Fauna Silvestre, SARH, México, 1994.

Crow J. F. and K. Aoki. 1984. Group selection for a polygenic behavioral trait: Estimating the degree of population subdivision. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81:6073-6077.

Echt, C. S., May Marquardt, P., M. Hseih and R. Zahorchak. 1998. Characterization of microsatellite markers in eastern white pine. Genome, 39: 1102-1108.

Excoffier, L., G. Laval and S. Schneider (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online 1:47-50.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution, 39: 783-791.

Ferreira, M. E. y D. Grattapaglia. 1998. Introducción al Uso de Marcadores Moleculares en el Análisis Genético. Ed. EMBRAPA, Brasilia, D.F., Brasil. 216 p.

Freeland, R. J. 2005. Molecular Ecology. John Wiley and Sons, Chichester, England. 388 p.

García de León, F. J. 2001. Marcadores genéticos en el conocimiento y manejo de recursos bióticos. Revisión. Ed. BIOTAM n.s. 12(3): 57-80.

Gillies, A. C. M., C. Navarro, A. J. Lowe, A. C. Newton, M. Hernández, J. Wilson and J. P. Cornelius (1999). Genetic diversity in Mesoamerican populations of mahogany (*Swietenia macrophylla*), assessed using RAPDs. Heredity, 83: 722–732.

Golstein, D. B., L. A. Ruíz., L. L. Cavalli-Sforza and M. W. Feltman. 1995. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. Genetics, 139: 463-471.

Hartl, D. L. and A. G. Clark. 1997. Principles of population genetics. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.

INEGI. 2007. Áreas naturales protegidas por entidad federativa, según categoría y ecosistema. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e informática (INEGI). México, D.F. Web (www.inegi.org.mx).

Kimura, M. and J. F. Crow. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. Genetics, 49: 725-738.

Lemes M. R., R. Gribel, J. Proctor and D. Grattapaglia. 2003. Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King: Meliaceae) across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite loci: implications for conservation. Molecular Ecology, 12: 2875-2883.

Lemes, M. R., R. P. V. Brondani and D. Grattapaglia. 2002. Multiplexed systems of microsatellite markers for genetic analysis of mahogany, *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae), a threatened Neotropical timber species. Journal of Heredity, 93: 287–291.

Lowe, A. J., B. Jourde, P. Breyne, N. Colpaert, C. Navarro, J. Wilson and S. Cavers. 2003. Fine-scale genetic structure and gene flow within Costa Rican populations of mahogany (*Swietenia macrophylla*). Heredity, 90: 268-275.

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

Miller, M. P. 1997. Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3: A windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Distributed by the author.

Navarro, C. y G. Hernández. 2004. Progeny analysis and population differentiation of Mesoamerican mahogany (*Swietenia macrophylla*). Agronomía Costarricense, 28: 37-51.

Navarro, C. 1999. Diagnóstico de la caoba (*Swietenia macrophylla* King) en Mesoamérica. Silvicultura-Genética. Centro Científico Tropical. PROARCA/CAPAS. pp. 1-25.

Novick, R. R., C. W. Dick., M. R. Lemens, C. Navarro, A. Caccone, and E. Birmingham 2003. Genetic structure of Mesoamerican populations of big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla*) inferred from microsatellite analysis. Molecular Ecology, 12: 2885-2893.

Otha T. and M. Kimura. 1973. A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. Genetical Research, 22: 201–204.

Outborg, N. J., Y. Piquot and J. M. Van Groenendael. 1999. Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. Journal Ecology, 87: 551-568.

Patiño, V. F. 1997. Recursos Genéticos de *Swietenia* y *Cedrela* en los Neotropicos: Propuestas para acciones coordinadas. Basados en trabajos elaborados para la FAO por P. Y. Kageyama, C. Linares, C. Navarro y F. Patiño. Dirección de Recursos Forestales, Departamento de Montes, FAO, Roma, Italia.

Pennington, T. D. y J. Sarukhan. 1968. Manual para la identificación de campo de los principales árboles de México. INIF-FAO-SAG. México. 413 p.

Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. Genetics, 139: 457-462.

Slatkin, M. 1994. Flujo génico y estructura de las poblaciones. Ecological Genetics, pp. 1-11.

Slatkin M. and N. H. Barton. 1989. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution*, 43: 1349-1368.

Takezaki, N. 2001. NJBAFD: a program for neighbor-joining tree construction from allele frequency data. National Institute of Genetics, Japan.

Rebollar, D.S., V. G. Santos y R. L. S. Aguilar. 2002. Estrategias de recuperación de selva en dos ejidos de Quintana Roo, México. Madera y Bosque, 8: 19-38.

SEMARNAT. 2006. Atlas de experiencias comunitarias en manejo sostenible de los recursos naturales de Quintana Roo. Primera edición, septiembre, México. pp. 3-7,14, 24.

Vázquez-Lobo, A. 1996. Evolución de hongos endófilos del género *Pinus* L: Implementación de técnicas moleculares y resultados preliminares. Tesis Biología. Facultad de Ciencias. UNAM.

White, G. and W. Powell. 1997. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Swietenia humilis* (Meliaceae): an endangered tropical hardwood species. Molecular Ecology, 6: 851–860.

Wright, S. 1978. Evolution and the Genetics of Populations vol. 4, Variability within and among natural populations. University of Chicago Press, Chicago, IL.