

Universidad de Costa Rica
Facultad de Ciencias
Escuela de Biología
Programa de Licenciatura con Énfasis en Genética y Biotecnología

**Diversidad genética del árbol *Annona purpurea* Moc. & Sessé ex Dunal (Annonaceae)
utilizando microsatélites como marcadores moleculares**

Tesis sometida a consideración de la Comisión de Trabajos Finales de Graduación de la
Escuela de Biología para optar por el grado de Licenciatura en Biología con Énfasis en
Genética y Biotecnología

Irena Hilje Rodríguez

Ciudad Universitaria “Rodrigo Facio”, Costa Rica

2008

Esta tesis fue aprobada por la Comisión de Trabajos Finales de Graduación de la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Biología con énfasis en Genética y Biotecnología.

Miembros del Tribunal Examinador

Dr. Federico Albertazzi Castro
Director de Tesis

M.Sc. Heidy Villalobos Barrantes
Asesor
Miembro del Tribunal

M.Sc. Elmer G. García Díaz
Asesor
Miembro del Tribunal

M.Sc. Jorge Gómez Laurito
Invitado
Miembro del Tribunal

M.Sc. Federico Bolaños Vives
Director a.i. Escuela de Biología

Bach. Irena Hilje Rodríguez
Postulante

Ciudad Universitaria “Rodrigo Facio”, 27 de Junio de 2008

Dedicatoria

A mis padres, a mi hermano y a Leo.

Prefacio del autor

“Lo importante no es el fin del camino,
sino el camino.

Quien viaja demasiado aprisa
se pierde la esencia del viaje.”

- Louis L'Amour

Agradecimientos

Quiero agradecer primero a Dios por permitirme llegar hasta donde me encuentro hoy. A mis padres y a mi hermano Branko por su incondicional apoyo, comprensión y confianza durante toda mi carrera. Agradezco también a Leo por su paciencia, su amor y su presencia durante este largo viaje. A todos ellos por darme ánimo para seguir adelante en momentos de desaliento.

A mi tutor, profesor y consejero de tesis Federico Albertazzi por su gran ayuda y todos sus aportes durante la realización de mi tesis, tanto en el trabajo práctico y de laboratorio, como en el desarrollo de la parte intelectual de este estudio. A Heidy Villalobos por su atenta disposición y colaboración en todo momento y por su ayuda y sus enseñanzas en el laboratorio. Además agradezco a ambos por sus revisiones y sugerencias a la hora de corregir el documento.

A Elmer García por sus revisiones y consejos sobre la tesis.

A la Comisión de Trabajos Finales de Graduación de la Escuela de Biología y a los Miembros del Tribunal Examinador por su colaboración y consejos.

A la Vicerrectoría de Investigación por el financiamiento de este proyecto (VI-801-A5-009).

Agradezco a Catalina Benavides por su atención, colaboración y consejos durante la realización del mapa de distribución de los individuos de *Annona pupurea*.

De último pero no menos importante, quiero agradecer a mis compañeros y amigos del Laboratorio 4 y otros laboratorios del CIBCM, Ana María Conejo, Beatriz Ortiz, Melania Muñoz, Saylen Morales, Fernando Flores, Dennis Jiménez, Natalia Barboza, Eduardo Hernández, y al personal del CIBCM que de una u otra manera colaboraron conmigo durante la realización de esta investigación. También agradezco a mis compañeros de Biología por los momentos compartidos durante el transcurso de nuestra carrera.

Gracias de nuevo a todos.

Índice General

Contenido	Página
Portada	i
Hoja de Aprobación	ii
Dedicatoria	iii
Prefacio del autor	iv
Agradecimientos	v
Índice General	vi
Índice de Figuras	viii
Índice de Cuadros	ix
Índice de Abreviaturas	x
Resumen	xi
Capítulo I	13
1.1. Justificación	13
1.2. Antecedentes	14
Capítulo II	18
2.1. Marco Teórico	18
• <i>Annona purpurea</i>	19
2.2. Objetivo General	21
2.3. Objetivos Específicos	21
Capítulo III	24
3.1. Metodología	24
• Sitios de muestreo	24
• Recolección de muestras y extracción de ADN	25
• Electroforesis	26
• Espectrofotometría	27
• Amplificación de ADN	27
• Imprimadores utilizados	27
• Amplificación de los microsátélites	28
• Reacción de amplificación	28
• Programas de amplificación	28
• Electroforesis de los productos de amplificación	29
• Geles de poliacrilamida (Geles de secuenciación)	29
• Soluciones amortiguadoras utilizadas en la electroforesis	30
• Condiciones de la electroforesis en geles de poliacrilamida	30
• Tinción de plata	31
• Geles de agarosa	31
• Re-extracción de los ácidos nucleicos totales	32
• Análisis estadístico	33

Capítulo IV	35
4.1. Resultados	35
Capítulo V	42
5.1. Discusión	42
Capítulo VI	53
6.1. Conclusiones y Recomendaciones	53
Literatura Citada	55
Anexos	68
I. Mapa de ubicación de los individuos de <i>A. purpurea</i> analizados	68
II. Distribución de los individuos de <i>A. purpurea</i> por sitio de muestreo	69
III. Protocolo de extracción de ADN para <i>A. purpurea</i>	72
IV. Imprimadores utilizados para amplificar microsatélites en <i>A. purpurea</i>	75
V. Gel de poliacrilamida 6%-7M Urea pequeño	76
VI. Composición de los geles de poliacrilamida 6%-7M Urea	76
VII. Protocolo de extracción de ADN utilizando el Wizard® Genomic DNA Purification Kit de PROMEGA (Wisconsin, EUA)	77
VIII. Distograma basado en el análisis espacial de <i>A. purpurea</i> en Santa Rosa, utilizando la distancia de Tanimoto. Cada clase de distancia geográfica representa un rango de distancia de 96 m. La línea horizontal representa el promedio de la distancia de Tanimoto. Las líneas externas representan el límite inferior y superior del intervalo de confianza de 99%.	79
IX. Distancias genéticas de Nei (Nei 1978) obtenidas entre los sitios de recolecta de <i>A. purpurea</i> y utilizadas para construir el dendrograma basado en UPGMA.	80

Índice de Figuras

Contenido	Página
Figura 1. Análisis de Coordenadas Principales de la variación de microsatélites en <i>A. purpurea</i> . Se incluyen los 96 individuos analizados.	39
Figura 2. Dendrograma de <i>A. purpurea</i> basado en las distancias genéticas de Nei (1978) entre los sitios de recolecta y obtenido mediante UPGMA con 100 valores de reemplazo. Los valores de las ramas representan las distancias genéticas entre los sitios.	40
Figura 3. Dendrograma de <i>A. purpurea</i> basado en las distancias genéticas de Nei (1978) entre todos los individuos analizados obtenido mediante UPGMA con 100 valores de reemplazo. Los individuos están identificados con el número de recolecta y el nombre abreviado de cada sitio de recolecta: SR (Santa Rosa), Ni (Nicoya) y PO (Península de Osa).	41

Índice de Cuadros

Contenido	Página
Cuadro 1. Proporción de loci polimórficos, índice de diversidad de Nei (1973) e índice de diversidad de Shannon (Shannon & Weaver 1949) para 22 marcadores polimórficos en los 96 individuos de <i>A. purpurea</i> .	38
Cuadro 2. Análisis de varianza molecular (AMOVA) dentro y entre los tres sitios de recolecta de <i>A. purpurea</i> .	38
Cuadro 3. Correlación (r^2) entre distancia genética y distancia geográfica utilizando la prueba de Mantel (1967) para los tres sitios de recolecta de <i>A. purpurea</i> .	38

Índice de abreviaturas

Lista de Unidades, Abreviaturas y Siglas en orden alfabético

22

Resumen

Se estudió la diversidad genética de tres poblaciones naturales de *Annona purpurea* en el bosque seco y el bosque húmedo de Costa Rica. *A. purpurea* es una especie frutal tropical escasamente cultivada, que se distribuye desde México hasta Panamá y parte de Suramérica y posee gran potencial de domesticación. Se utilizaron cinco imprimadores diseñados inicialmente para la amplificación de microsatélites en la especie *Annona cherimola* por Escribano *et al.* (2004). Se analizaron 39 individuos de Santa Rosa, 45 de Nicoya y 12 de la Península de Osa. Los cinco imprimadores produjeron 22 bandas polimórficas entre los 96 individuos analizados.

Esta especie mostró una diversidad genética comparable con la de otras especies de árboles tropicales ($H_S=0.10-0.27$, $H_T=0.27$; $F_{ST}=0.23$) y otras Anonáceas. Los análisis de diversidad mostraron mayor diversidad genética en Osa. Además se encontró mayor variación genética dentro (73%; $P=0.01$) que entre (27%; $P=0.01$) los sitios de muestreo. Estos resultados de varianza molecular concuerdan con resultados obtenidos en estudios con otras especies de plantas silvestres y árboles tropicales. Los análisis mostraron que la distribución de los árboles de *A. purpurea* en los tres sitios es agregada y no al azar.

Además de la poca diferenciación entre los sitios de recolecta, no se encontró correlación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas en el caso de Santa Rosa y Nicoya, ni una estructura genética espacial en ninguno de los tres sitios estudiados. Esto junto con el valor de phi estándar obtenido ($\Phi_{ST}=0.2720$, $P=0.01$), sugieren que la dispersión de genes podría ser efectiva entre los lugares examinados. Sin embargo, la posible explicación a la falta de estructura espacial y a la poca diferenciación genética entre los sitios puede deberse más a factores históricos y no al actual flujo de genes. En el caso de Osa, sí se encontró una correlación significativa entre la distancia genética y geográfica ($r^2=0.4709$, $P=0.01$) que demuestra que hay aislamiento por distancia y por lo tanto los árboles más similares genéticamente se encuentran agrupados.

Los análisis de agrupamiento (dendrogramas) no lograron definir claramente la relación entre los individuos en los tres sitios. Algunos individuos de Osa parecen estar más

emparentados con los de Santa Rosa, mientras que otros muestran mayor relación con los de Nicoya.

Este es el primer estudio de diversidad genética en *A. purpurea* basado en el análisis de microsatélites en Costa Rica. Para mejorar los resultados obtenidos en este estudio, se recomienda extender el número y probar otros pares de imprimadores desarrollados para *A. cherimola* por Escribano y colaboradores (2008), que amplifiquen con éxito y que sean informativos para *A. purpurea*. Además, se necesita incluir más individuos y más sitios con poblaciones silvestres de Soncoya para tratar de resolver la relación entre los individuos.

Estudios como éste proveen información esencial sobre caracteres moleculares de una especie, que en conjunto con el estudio de factores ecológicos y caracteres cuantitativos, permiten desarrollar estrategias más efectivas y sensibles para la conservación o el manejo sostenible de los recursos genéticos.

Palabras claves: *Annona purpurea*, árboles tropicales, bosque tropical seco, bosque tropical húmedo, especies frutales, exocruzamiento, imprimadores, diversidad genética, marcadores moleculares, microsatélites, PCR, poblaciones, polimorfismo, Soncoya.

CAPÍTULO I

1.1 Justificación

Los primeros estudios y predicciones sobre la estructura genética de las poblaciones de árboles tropicales surgieron como parte del esfuerzo por explicar la gran diversidad de especies de árboles que caracteriza a los bosques neotropicales. Este tipo de estudios son fundamentales para entender los procesos ecológicos y evolutivos en las poblaciones naturales (Nason 2002, Jones & Hubbell 2006).

Con el advenimiento de los marcadores moleculares, se ha incrementado el conocimiento en cuanto a las poblaciones de especies de plantas nativas. Un tipo de marcador molecular son los microsatélites, los cuales se han utilizado en estudios de poblaciones naturales (Dayanandan *et al.* 1997, Collevatti *et al.* 2001, Collevatti *et al.* 2003, Zucchi *et al.* 2003, Gao 2005, Zaghoul *et al.* 2006) debido a que son altamente polimórficos en comparación con otros marcadores. Se han utilizado ampliamente como herramienta para responder a ciertas preguntas sobre genética de poblaciones, por ejemplo flujo de genes y mapeo genético (Zucchi *et al.* 2003, Lowe *et al.* 2004, Gao 2005), y por ello los microsatélites son cada vez más utilizados para estudiar la variación genética en las poblaciones naturales.

El conocer, estudiar y entender cómo está distribuida la variación genética entre y dentro de las poblaciones puede tener implicaciones importantes en los estudios de ecología y conservación. Por lo tanto, las estimaciones de la diferenciación a nivel de poblaciones son esenciales para entender la conectividad entre las mismas y aportan información valiosa para desarrollar estrategias de conservación (Balloux & Lugon-Moulin 2002, Zucchi *et al.* 2003, Gao 2005). Estudios anteriores han demostrado que los microsatélites son altamente sensibles en la detección de diferenciación entre poblaciones (Zucchi *et al.* 2003, Gao 2005). Es por ello que en el presente estudio se quiere estimar la variación genética dentro y entre poblaciones de la especie tropical *Annona purpurea* utilizando este tipo de marcadores.

Es importante conocer cómo está distribuida la variación genética en las poblaciones de *A. purpurea* en Costa Rica, ya que esta especie podría ser de importancia comercial debido a su potencial de domesticación para el consumo humano, al igual que *A. cherimola* y otras anonáceas que han sido recientemente domesticadas y cultivadas comercialmente (Orellana & Martínez 2002). Además, conocer el grado de diversidad de los recursos fitogenéticos es fundamental para la seguridad alimentaria, especialmente si se trata de especies frutales, ya que muchas de ellas son subutilizadas y poseen gran potencial para su domesticación y consumo, como en el caso de varias Anonas (Escribano *et al.* 2008a).

Los procesos de domesticación en especies de árboles frutales que han sido propagadas vegetativamente, usualmente han involucrado pocos ciclos de recombinación. Debido a esto, los genotipos que han sido domesticados recientemente son semejantes a sus ancestros silvestres ya que aún reflejan la variación genética presente en las poblaciones silvestres (Escribano *et al.* 2008a). En el mundo existen más de 250 especies de frutales tropicales, sin embargo, sólo se explotan comercialmente algunas de ellas. Las razones de ello son la poca investigación, y la falta de promoción y de alternativas para su comercialización. La erosión genética así como el alto valor económico, son algunos de los factores por lo que los recursos fitogenéticos deben rescatarse y conservarse (Cruz & Deras 2000b). En países como El Salvador, algunas especies de *Annona* como *A. reticulata*, *A. purpurea*, *A. cherimola*, *A. squamosa*, *A. glabra* y *A. holosericea* se encuentran en peligro de extinción. Esto implica que puedan perderse características importantes que pueden ser aprovechadas para la preservación de estas especies de alto valor genético y cultural (Cruz & Deras 2000a). Por todo esto, es de crucial importancia conocer la variabilidad de *A. purpurea* y sus especies relacionadas.

1.2 Antecedentes

Se ha estudiado la estructura y variación genética de poblaciones de árboles del bosque tropical principalmente a partir de aloenzimas. Para utilizarlas como un tipo de

marcador molecular se debe suponer que la variación alélica es neutra con respecto a la selección natural. Sin embargo, se ha encontrado evidencia de selección en algunos loci (Lowe *et al.* 2004). En general, los marcadores moleculares más utilizados en estudios ecológicos parecen ser neutrales con respecto a la selección natural y eso permite observar en los diferentes loci las fuerzas de la deriva genética y del flujo de genes. Independientemente de la pregunta que se quiera responder, un marcador molecular debe ser selectivamente neutral y seguir herencia Mendeliana para poder ser utilizado como herramienta para detectar patrones demográficos; y estos rasgos deben ser siempre confirmados para cualquier tipo de marcador (Selkoe & Toonen 2006).

La diversidad genética de una o varias poblaciones se puede estudiar utilizando los marcadores moleculares como una herramienta importante para determinar el efecto de los sistemas de apareamiento, y la dinámica de dispersión del polen y de las semillas en dichas poblaciones. Así como las aloenzimas, existen otros marcadores moleculares que pueden ser utilizados como RFLPs (“Restriction Fragment Length Polymorphism”), RAPDs (“Random Amplified Polymorphic DNA”), AFLPs (“Amplified Fragment Length Polymorphism”), VNTRs (“Variable Number of Tandem Repeats”) y microsatélites o SSRs (“Simple Sequence Repeat”).

Los análisis con aloenzimas tienen el inconveniente de que a veces detectan bajos niveles de polimorfismo comparado con otros marcadores. De forma paralela, se necesita conocer bien las enzimas y el nivel de poliploidía de la especie. Además, muchas veces los datos sólo se pueden analizar haciendo experimentos con cruces controlados (Lowe *et al.* 2004). Los RFLPs son marcadores codominantes que pueden detectar polimorfismos en el ADN nuclear y el de organelas. Sin embargo, los análisis de RFLPs necesitan de grandes cantidades de muestra, son costosos y requieren mucho tiempo de detección así como un ADN de calidad, y en cantidades mayores que el requerido para las técnicas de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Los RAPDs utilizan decámeros inespecíficos como imprimadores, para amplificar polimorfismos en el ADN utilizando PCR. Es una técnica simple, barata y no requiere conocer la secuencia a amplificar; además requiere de poco material genético inicial. Sin embargo, se ha encontrado baja reproducibilidad y no se

puede distinguir entre individuos homocigotos y heterocigotos por ser un marcador dominante (Karp *et al.* 1996, Goldstein & Schlötterer 1999, Lowe *et al.* 2004, Kremer *et al.* 2005).

Por su parte, los análisis con AFLPs involucran una amplificación selectiva de fragmentos de restricción inespecíficos generados por la doble digestión del ADN con dos tipos de enzimas de restricción. Son altamente polimórficos, pueden ser dominantes o codominantes y no se requiere conocer la secuencia a amplificar. Sin embargo, esta técnica requiere un alto grado de destreza y grandes cantidades de ADN, superiores a la necesaria para RAPDs, pero inferior que para RFLPs. Los SSRs o microsatélites utilizan imprimadores diseñados para amplificar la secuencia variable que se encuentra entre secuencias conservadas (Karp *et al.* 1996, Goldstein & Schlötterer 1999, Lowe *et al.* 2004). Los microsatélites son regiones de ADN con número variable de repeticiones cortas de secuencia única (mono a hexanucléotidos) repetidas consecutivamente. Se encuentran distribuidos al azar en el genoma y cada uno posee diferentes alelos. En este caso, un alelo se define por el número de repeticiones que hay en una misma localización. Si existen muchos alelos, la mayoría de los individuos en una población tienden a ser heterocigotos (Goldstein & Schlötterer 1999, Lowe *et al.* 2004).

Los microsatélites han adquirido una importancia creciente en los últimos años debido a que son marcadores genéticos que se encuentran distribuidos uniformemente en el genoma, son abundantes, se heredan de forma codominante y poseen un alto grado de variabilidad en las poblaciones. Presentan altas tasas de mutación en comparación con otros marcadores moleculares, por lo que los hace útiles para estudios poblacionales, de paternidad, de flujo de genes, identificación de muestras y mapeo genético (Dayanandan *et al.* 1997, Arnold *et al.* 2002, Squirrell *et al.* 2003, Zucchi *et al.* 2003, Lowe *et al.* 2004). Además, es posible detectarlos tanto en el ADN nuclear como en el ADN de las organelas (Morera *et al.* 1999, Lowe *et al.* 2004). Otra ventaja de utilizar microsatélites como marcadores moleculares es que se requiere de poco material genético de muestra en comparación con otras técnicas. Además, mediante PCR se puede amplificar el marcador de interés aún cuando el material genético esté un poco degradado. Este tipo de marcador

molecular es una de las técnicas más populares en estudios ecológicos porque tienen el potencial de estimar procesos de migración, y de distinguir entre altas tasas de migración y panmixia, así como estimar la relación entre individuos (Selkoe & Toonen 2006).

La identificación inicial de los microsatélites es generalmente costosa y requiere de clonación y secuenciación previa, a partir de bibliotecas genómicas, para el diseño de imprimadores específicos que puedan amplificar dichos polimorfismos (Squirrell *et al.* 2003, Zucchi *et al.* 2003, Nybom 2004). Sin embargo, se ha demostrado que imprimadores diseñados para algunas especies pueden ser utilizados para detectar polimorfismos en loci homólogos de especies relacionadas, como en el caso de algunas plantas tropicales (Dayanandan *et al.* 1997, Arnold *et al.* 2002, Zucchi *et al.* 2003, Escribano *et al.* 2004, Mix *et al.* 2004, Schnell *et al.* 2005, Escribano *et al.* 2008b). Esto hace que no se tengan que conocer *a priori* las secuencias de las especies bajo estudio. Por lo tanto, los microsatélites son ideales para ser utilizados cuando se hayan realizado pocos o ningún estudio previo de genética molecular para una especie en particular, como ocurre con la mayoría de las plantas silvestres (Nybom 2004). En el caso de la familia *Annonaceae*, se han amplificado con éxito microsatélites en diferentes especies, utilizando imprimadores diseñados inicialmente para la amplificación de microsatélites en *Annona cherimola* (Escribano *et al.* 2004, Escribano *et al.* 2008b), por lo que se utilizaron algunos de esos imprimadores en el presente estudio de *A. purpurea*.

CAPÍTULO II

2.1 Marco teórico

Para estudiar la diversidad genética de una especie se puede partir de tres puntos diferentes: i) estudiando individuos independientes, ii) considerando una población en particular o iii) comparando poblaciones distintas. Para un individuo, la diversidad genética se define de acuerdo con las frecuencias alélicas y el grado de heterocigosis o proporción de loci con alelos distintos respecto al total de alelos examinados. A nivel de poblaciones, la diversidad genética la define tanto el tipo de alelos presentes, como sus frecuencias relativas, y se puede expresar a nivel de una población o entre varias poblaciones. Esto es lo que conforma la estructura genética de una población. De esta manera, cuando se habla de diversidad genética entre poblaciones distintas de una misma especie, se refiere a las diferencias que se encuentran en el acervo genético de las mismas, producto de diferentes factores biológicos y geográficos, que ocurren a lo largo de la distribución natural de la especie (Nason 2002).

La estructura genética de una población es afectada por fuerzas evolutivas diferentes. Dentro de ellas se encuentran la selección natural y la deriva genética, que favorecen la diferenciación, y por otro lado, el flujo de genes que permite el intercambio de material genético entre poblaciones y hasta cierto punto tiende a homogenizar o minimizar la diversidad genética entre ellas. La variación genética se produce continuamente debido a mutaciones, y en ocasiones ésta se va perdiendo o erosionando producto de la selección y la deriva genética. La habilidad de las especies de responder a la selección natural depende de la presencia de variación heredable. Si existe variabilidad dentro de las especies, ésta le va a permitir a algunos individuos sobrevivir y reproducirse si ocurre alguna alteración en las presiones selectivas debido a cambios ambientales (Nason 2002, Lowe *et al.* 2004). Dicha variación dentro de las especies es un concepto fundamental para los ecólogos genetistas y posee tres componentes: i) la diversidad o cantidad de varianza genética, ii) la diferenciación genética o distribución de la variación entre poblaciones, y iii) la distancia genética o cantidad de diferenciación entre pares de poblaciones (Lowe *et al.* 2004).

El proceso de fragmentación de los bosques o las barreras biogeográficas también pueden llevar a cambios en la estructura genética de una población ya que limitan el flujo de genes entre las poblaciones (Arnold *et al.* 2002, Nason 2002, Collevatti *et al.* 2001). Por lo tanto, el balance que logre una población entre su aislamiento y el flujo genético va a determinar su potencial para formar una estructura genética particular para adaptarse y generar nuevas especies o subpoblaciones (Nason 2002).

Annona purpurea

La familia Annonaceae es una de las más grandes del orden Magnoliales, con alrededor de 2300 especies, distribuidas en 28 géneros (Orellana & Martínez 2002, Escribano *et al.* 2004, Escribano *et al.* 2008b). Tres géneros contienen especies con frutos comestibles. Dentro de estos se encuentra *Annona*, que contiene alrededor de 119 especies, la mayoría de las cuales son de distribución neotropical (Gentry 1993, Escribano *et al.* 2004, Pinto *et al.* 2005). Una de ellas es *Annona purpurea*, la cual se distribuye desde México hasta Panamá y parte de Suramérica. Se le conoce como sincuya, soncoya o toreta. Es una especie escasamente cultivada. En Costa Rica se localiza en el Pacífico Seco donde se puede observar principalmente al noroeste de la provincia de Guanacaste y también desde el Valle Central hasta la Península de Osa, entre los 0 y los 400 msnm. Crece como árbol o arbusto de 4 a 10 m de altura, de corteza lisa, grisácea y muy fibrosa. Sus hojas pubescentes son simples, alternas y dísticas. Las flores de *A. purpurea* son grandes y rosadas y crecen de manera solitaria sobre las axilas de las hojas. Son hermafroditas y se pueden observar en los meses de febrero, abril, mayo, julio, setiembre y octubre. Por su parte, los frutos se aprecian en junio, julio y setiembre (Zamora *et al.* 2000). Son agregados, globosos, ampliamente ovoides o esféricos de 15 a 20 cm de diámetro, con numerosas protuberancias rígidas piramidales y muchas semillas negras (Zamora *et al.* 2000). En la literatura se describen frutos con numerosas semillas negras, sin embargo, los frutos recolectados en las zonas de muestreo presentaban semillas café (obs. pers.). La pulpa comestible de los frutos es anaranjada, fibrosa, fragante y con cierto sabor amargo. Esta especie se puede distinguir

de otras del género *Annona* por sus hojas grandes, membranosas, con numerosos nervios secundarios y por la estructura de sus frutos (Zamora 1989, Zamora *et al.* 2000, Orellana & Martínez 2002, Pinto *et al.* 2005). Se ha encontrado que las hojas, raíces, corteza y hasta los frutos y semillas de algunas anonáceas contienen muchas sustancias químicas activas como acetogeninas, alcaloides, terpenos, flavonoides y aceites con propiedades insecticidas y medicinales (Kotkar *et al.* 2002, Zhang *et al.* 2004, Pinto *et al.* 2005, Khalequzzaman & Sultana 2006). Las acetogeninas anonáceas en particular, son un grupo de compuestos que se han aislado de varias especies del género *Annona*, y se ha visto que algunas de ellas exhiben fuerte actividad anticancerígena, lo que las convierte en tratamientos potenciales contra el cáncer debido a sus efectos citotóxicos (Liaw *et al.* 2004, Zhang *et al.* 2004). Además, la pulpa de algunas anonas poseen proteínas, ácidos grasos, fibra, carbohidratos, minerales y vitaminas importantes para la dieta humana (Pinto *et al.* 2005).

A. purpurea es una especie diploide, cuya reproducción se da por exocruzamiento. La polinización es llevada a cabo por insectos y algunas veces por el viento. Debido a que sus flores son protoginias (los pistilos maduran antes de que el polen sea liberado de las anteras para evitar la deposición de polen en los estigmas de una misma flor) al igual que en otras anonáceas, se cree que la autopolinización no es una regla para esta especie (Peña 2003, Pinto *et al.* 2005). Otra táctica utilizada por ésta y otras varias anonáceas para evitar la autopolinización consiste en prevenir el transporte de polen entre flores diferentes de una misma planta, lo cual se logra sincronizando la floración. En este caso, las flores que están abiertas tienen un solo sexo funcional durante un período determinado, y de esta manera se logra una incompatibilidad temporal entre el polen y el óvulo de la misma planta (Peña 2003).

2.2 Objetivo General

- Estimar la diversidad genética de *Annona purpurea* en tres sitios del bosque seco y del bosque muy húmedo de Costa Rica, específicamente de Nicoya, Santa Rosa y de la Península de Osa, utilizando microsatélites como marcadores moleculares.

2.3 Objetivos específicos

- Estimar la diversidad genética dentro de los sitios y entre los sitios de recolecta de *A. purpurea*.
- Estimar la autocorrelación espacial y genética de los individuos, para cada uno de los sitios.

Lista de Unidades, Abreviaturas y Siglas en orden alfabético

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
APS	Persulfato de Amonio
ARN	Ácido Ribonucleico
Bis	N-N'-Metileno-Bis-Acrilamida
CIBCM	Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular
cm	Centímetro(s)
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
°C	Grados centígrados
DETC	Ácido dietilditiocarbámico
dNTPs	Deoxirribonucleósidos Trifosfatados (dATP,dGTP,dCTP,dTTP)
EDTA	Etilendiaminotetraacetato de Sodio
EtOH	Etanol
g	Gramo(s)
ha	Hectárea(s)
H_E	Heterocigosis esperada
H_O	Heterocigosis observada
Hpop	Heterocigosis de la población
H₂O d.d.	Agua destilada y desionizada
hr	Hora(s)
kb	Kilobase(s)
KCl	Cloruro de Potasio
km	Kilómetro(s)
m	Metro(s)
M	Molar
Mbp	Mega pares de bases
mg	Miligramo(s)

MgCl₂	Cloruro de Magnesio
min	Minuto(s)
ml	Mililitro(s)
mm	Milímetro(s)
mM	Milimolar
msnm	Metros sobre el nivel del mar
NaCl	Cloruro de Sodio
NaOAc	Acetato de Sodio
ng	Nanogramo(s)
nm	Nanómetro(s)
pb	Pares de Bases
PCR	“Polymerase Chain Reaction” (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
PhiST (Φ)	Phi estándar
PVP	Polivinilpirrolidona
RNAsa	Ribonucleasa A
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo(s)
TBE	Tris-HCl/Ácido Bórico/EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetrametiletildiamina
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
Tris-HCl	Trizma Base Equilibrado con Ácido Clorhídrico
vol	Volumen
µg	Microgramo(s)
µl	Microlitro(s)
µM	Micromolar
UV	Ultravioleta

CAPÍTULO III

3.1 Metodología

Sitios de muestreo

Se muestrearon varios sitios del bosque seco y del bosque muy-húmedo de Costa Rica para recolectar *Annona purpurea*.

Se escogieron dos zonas del bosque seco de Costa Rica, específicamente Nicoya, una finca de aproximadamente 100 hectáreas llamada El Alto (10°06' a 10°07' N°, 85°20' a 85°21' O), y el Parque Nacional Santa Rosa (10°45' a 11°00' N°, 85°30' a 85°45' O), el cual pertenece al Área de Conservación Guanacaste (ACG). Además se analizaron individuos de bosque muy húmedo pertenecientes a varias zonas de la Península de Osa (08°53'N, 83°30'O), Puntarenas, específicamente a Matapalo (08°23' N, 83°17' O), al Refugio de Vida Silvestre Preciosa Platanares (08° 31'N, 83°-17'O), y a Bahía Drake (08°40' N, 83°42' O) (Anexos I y II para ver mapa y distribución de lo individuos por sitio). La zona de Matapalo es un cabo que se encuentra en el extremo sureste de la Península de Osa, a 29 km al sur de Puerto Jiménez; el Refugio de Vida Silvestre Preciosa Platanares es una zona marino-costera protegida que abarca 226 ha de las 145.425 ha que pertenecen al Área de Conservación Osa (ACOSA). Ambos sitios pertenecen al cantón de Golfito, mientras que Bahía Drake pertenece al cantón de Osa (Kappelle *et al.* 2003, Zuñiga *et al.* 2003).

La finca El Alto en Nicoya contempla un proyecto de recuperación donde predomina un bosque secundario y ripario de unos veinte años de protección; el tipo de bosque predominante es similar al del Parque Nacional Barra Honda que se ubica a 5 km de distancia en línea recta. El Parque Nacional Santa Rosa abarca un área de 10 700 ha y está compuesto por una mezcla de bosques con diferentes estados sucesionales así como pastizales abandonados, producto de la intervención del hombre. Este tipo de bosque, tropical seco, es uno de los ecosistemas más amenazados en el mundo y actualmente queda sólo cerca del 0.09% del área original en Mesoamérica (Janzen 1986, Fuchs *et al.* 2003). El clima de la zona es estacional, con una estación seca que inicia a finales de noviembre y se

extiende hasta mediados de mayo. La precipitación anual oscila entre los 800 y los 2800 mm. (Janzen 1986, Janzen 1991, Janzen 2004). La temperatura varía entre 18-22°C durante la noche y 26-36°C durante el día. Las temperaturas nocturnas más bajas se presentan durante la época seca. Las temperaturas diurnas más altas ocurren entre abril y mayo y las más bajas entre octubre y noviembre (Janzen 2004).

La Península de Osa y sus alrededores es una de las zonas más lluviosas del país y su precipitación alcanza valores hasta de 5000 mm por año en los cerros más elevados. La precipitación promedio anual oscila entre los 2500 y 6000 mm con una breve estación seca. La humedad relativa para la zona oscila entre 79 y 90%. La época lluviosa va de mayo a noviembre y la seca de diciembre a abril. La temperatura media anual varía entre 24 y 27°C. En su estado inalterado, los bosques de este bioclima poseen una altura que varía entre 40 y 50 m, pero hay árboles que sobrepasan esta altura. Aproximadamente un tercio de las especies de árboles en Costa Rica se han registrado en la región, incluyendo la mitad de las especies de árboles amenazadas del país. Por sus características y aislamiento con respecto a otras áreas boscosas, estos ecosistemas enfrentan alta fragilidad de conservación, y su flora y fauna constituyen una reserva de mucha importancia a nivel mundial. El tipo de bosque de este bioclima es siempre verde, con pocas especies deciduas durante la época seca. Presenta tres estratos y muchas especies de árboles poseen gambas; además las epífitas y las lianas son abundantes. La vegetación de la Península de Osa posee una gran afinidad florística con los bosques suramericanos. Debido a su posición geográfica, esta zona constituye un puente natural entre especies del norte y del sur del continente americano (Kappelle *et al.* 2003, Rosero *et al.* 2002).

Recolección de muestras y extracción de ADN

En los lugares indicados, se recolectaron hojas jóvenes y en buen estado de diferentes árboles de *A. purpurea*, así como algunos frutos presentes en el momento de la recolección. Dependiendo de la cantidad de individuos en cada sitio, se recolectaron hojas de al menos un individuo por sitio y hasta de 45 como máximo, de forma aleatoria y de

árboles con una circunferencia mayor a los 30 cm, ya que se ha observado que los que presentan una menor circunferencia no producen flores (Albertazzi com. pers.). En Nicoya y Santa Rosa, ningún individuo presentaba flores o frutos. En el caso de Osa, algunos individuos presentaban flores y/o frutos, mientras que otros al igual que los de Guanacaste, carecían de ellos. Cada árbol se tomó como un individuo y para cada uno de ellos se utilizó un código de identificación. En Bahía Drake sólo se recolectaron hojas del único ejemplar de *A. purpurea* que había en esa zona. De todos los individuos se tomaron datos de ubicación con coordenadas geográficas, región y fecha de recolecta de cada muestra, entre otros, y se introdujeron en una base de datos. Se recolectaron de tres a seis hojas jóvenes como muestras de cada árbol. Éstas se colocaron dentro de bolsas plásticas y en hielo a 4°C y se trasladaron al laboratorio, en el Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), donde se conservaron en congelación a -20°C. Las muestras procedentes de Santa Rosa fueron recolectadas por Kirsten Ellegaard previamente.

Del material vegetal congelado se extrajeron los ácidos nucleicos totales utilizando una modificación del protocolo de extracción con 2X CTAB de Doyle & Doyle (1990) (Anexo II).

Electroforesis

Para verificar la calidad de las extracciones de ácidos nucleicos totales y el ADN, se corrieron las muestras en geles de agarosa de 0.8-1.2%, en una solución amortiguadora TBE 1X a 90 voltios constantes. Dicha solución de corrida está compuesta por Tris-HCl 0.089 M; pH=8.0, ácido bórico 0.089 M y EDTA 0.0025 M; pH=8.0. Se cargaron 8 µl de muestra en cada pozo, junto con 4 µl de solución amortiguadora de carga para geles de agarosa. Esta solución de carga está compuesta por Glicerina 50%, Azul de Bromofenol 0.25% y Xilen Cianol FF 0.25%. Al finalizar la electroforesis se tiñó el gel con bromuro de etidio (10 µl de bromuro de etidio 10 mg/ml diluidos en 100 ml de H₂O bidestilada) durante 20 minutos.

Espectrofotometría

Para cuantificar la concentración y pureza del ADN extraído, se midió la absorbancia de cada una de las muestras, utilizando espectrofotometría de luz UV a 260/280 nm. Para ello se utilizó un espectrofotómetro Unicam UV-Visible (Thermo Spectronic, EUA). Para las lecturas de cada muestra se tomaron 10 µl de muestra y se diluyeron con 990 µl de agua bidestilada para tener una concentración 1:100 v/v de muestra.

Amplificación del ADN

Imprimadores utilizados

Para detectar polimorfismos en cada uno de los individuos de *A. purpurea*, se hicieron reacciones de PCR para todas las muestras, utilizando 6 de los 15 pares de imprimadores diseñados para amplificar microsatélites en *Annona cherimola* descritos por Escribano *et al.* (2004). Estos imprimadores se eligieron de acuerdo con la información suministrada por Escribano *et al.* (2004), y con base en resultados previos obtenidos por Kirsten Ellegaard (2005). Los 15 imprimadores del estudio de Escribano y colaboradores (2004) mostraron una transferencia variable entre las otras especies relacionadas con *A. cherimola*; por lo tanto, para aumentar el éxito de amplificación en *A. purpurea* se utilizaron los que mostraron amplificaciones exitosas en otras especies diferentes a *A. cherimola*: LMCH2, LMCH5, LMCH6, LMCH8, LMCH9, LMCH14 (Anexo III). A pesar de que LMCH6 no amplificó microsatélites en todas las especies analizadas, mostró el mayor número de alelos y se creyó que podría ser bastante informativo también para *A. purpurea*. Ninguno de estos imprimadores escogidos amplificó para más de un locus en *A. cherimola* (Escribano *et al.* 2004).

Amplificación de microsatélites

Por medio de PCR, que utiliza los extremos de dichas secuencias únicas como sitios de unión de los imprimadores, el ADN de los microsatélites de *A. purpurea* pudo ser amplificado. Las condiciones y los ciclos de amplificación de PCR se aplicaron de acuerdo con Escribano *et al.* (2004), con pequeñas modificaciones. Se verificaron las amplificaciones en geles de poliacrilamida como prueba, y en geles de agarosa, y se visualizaron las bandas mediante tinción de plata (Caetano-Anollés & Gresshoff 1994, Creste *et al.* 2001) y bromuro de etidio respectivamente.

Reacción de amplificación

Para la amplificación se utilizaron 10 μ l de volumen final conteniendo: 2 μ l de ADN resuspendido en agua bidestilada (15-30 ng de ADN), 2 μ l de $MgCl_2$ 25 mM (5 mM), 1 μ l de cada iniciador (100ng/ μ l) (Integrated DNA Technologies, IDT, San Diego, CA), 1 μ l de solución amortiguadora de PCR 10X (+KCl), 2 μ l de dNTPs 100mM (2.5 mM) (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia; Fermentas, Hanover, MD), 0.8 μ l de PVP 10% y 0.2 μ l de ADN Taq polimerasa (Fermentas, Hanover, MD).

Programas de amplificación

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador GeneAmp® 2700 de Applied Biosystems (California, EUA). Se utilizó el programa descrito por Escribano *et al.* (2004) con algunas modificaciones para los imprimadores utilizados.

Programa 1: Imprimadores LMCH2, LMCH6, LMCH9.

- Un primer ciclo de desnaturalización a 94°C por 2 min,

- 35 ciclos con tres temperaturas: 94°C 30 s
48°C 30 s
72°C 1 min
- Por último, un ciclo a 72°C por 3 min

Programa 2: Imprimadores LMCH5, LMCH8, LMCH14.

- Un primer ciclo de desnaturalización a 94°C por 2 min,
- 35 ciclos con tres temperaturas: 94°C 30 s
53°C 30 s
72°C 1 min
- Por último, un ciclo a 72°C por 3 min

El tiempo total de duración de ambos programas de amplificación es de aproximadamente dos horas.

Electroforesis de los productos de amplificación

A) Geles de poliacrilamida (Geles de secuenciación)

Para visualizar los productos de la amplificación se probó en geles desnaturalizantes de poliacrilamida 6%-7M Urea grandes y pequeños, sin embargo los resultados no fueron satisfactorios (ver Anexo IV). Para estos geles se preparó una mezcla de poliacrilamida-urea con un volumen final de 10 ml en el caso de los pequeños y 60 ml para los grandes, con una concentración final de 6% (Anexo V).

Soluciones amortiguadoras utilizadas en la electroforesis

a) Solución amortiguadora de corrida TBE 0.5X para geles de poliacrilamida-urea y TBE 1X para geles de agarosa

Tris-HCl, 0.089 M; pH=8.0

Acido Bórico 0.089 M

EDTA, 0.0025 M; pH=8.0

b) Solución amortiguadora de carga de muestra para geles de poliacrilamida-urea

Formamida Desionizada 98%

EDTA, 10 mM; pH=8.0

Xileno Cianol FF 0.2%

Azul de Bromofenol 0.2%

c) Solución amortiguadora de carga de muestra para geles de agarosa

Glicerina 50%

Xilen Cianol FF 0.25%

Azul de Bromofenol 0.25%

TBE 1X

Condiciones de la electroforesis en geles de poliacrilamida

Los vidrios sobre los cuales se corrió la mezcla de poliacrilamida-urea medían 7.3x10.1 cm y 8.2x10.1 cm para geles pequeños, y 33.3x39.3 cm y 33.3x41.8 cm para geles grandes. Antes de chorrear la mezcla, éstos se limpiaron previamente dos veces con papel toalla y etanol de 95% para eliminar impurezas. Luego se le aplicó al vidrio más grande una

solución de 1 μ l de Bind-Silane (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) disuelto en 1 ml de mezcla 95:5 de etanol-ácido acético para el caso de geles grandes, y en 250 μ l para el caso de geles pequeños. Se dejó secando durante 5 min y por último se limpió 6 veces con papel toalla y etanol de 95% para eliminar el exceso de dicha mezcla. Luego se colocaron dos espaciadores de vinil en los bordes del vidrio más grande, los cuales le darían el grosor al gel, y por último, se unieron los vidrios, se colocaron en el porta vidrios y se chorreó el gel. Se colocaron los peines respectivos y se esperó a que polimerizara. Una vez polimerizado el gel, se hizo una precorrida de 20 min y luego se cargaron y corrieron las muestras.

Los geles se corrieron durante 2:30 hr, utilizando como solución amortiguadora TBE 0.5X. Para los grandes se utilizó un equipo S2 para geles de secuenciación de Gibco BRL® (Life Technologies®, Maryland, EUA) a 50 watts constantes y utilizando una fuente de poder 3000xi de Bio-Rad (California, EUA). Para los pequeños por su parte, se utilizó una cámara de electroforesis Mini-PROTEAN® II de Bio-Rad (California, EUA), y una fuente de poder Power/Pac 300 de la misma casa comercial, a 90 voltios constantes.

En cada pozo se cargaron 5 μ l de cada muestra (producto de amplificación) mezclado con 2 μ l de la solución amortiguadora de carga para geles de poliacrilamida-urea. Además se utilizaron como control varios pozos cargados con 2 μ l de marcador de tamaño molecular 1 Kb de Fermentas (Maryland, EUA).

Tinción de plata

Finalizada la electroforesis, los geles de poliacrilamida-urea se tiñeron siguiendo el protocolo con nitrato de plata descrito por Caetano-Anollés & Gresshoff (1994) y Creste *et al.* (2001).

B) Geles de agarosa

Debido a las inconsistencias que presentaron las muestras en los geles de

poliacrilamida, se separaron los productos de PCR en geles de agarosa TopVision™ LE GQ de Fermentas (Maryland, EUA) al 3%, utilizando como solución amortiguadora TBE 1X a 100 voltios constantes. Dicha solución de corrida está compuesta por Tris-HCl 10 mM; pH=7.6 y EDTA 1 mM; pH=7.6. La agarosa TopVision™ LE GQ es de alta resolución.

Se corrieron los geles durante 50 min. a temperatura ambiente y a 4°C, obteniendo mejores resultados bajo estas últimas condiciones. Se cargaron 3µl de muestra resuspendida en agua bidestilada en cada pozo, junto con 3 µl de solución amortiguadora de carga para este tipo de matrices (Tris-HCl 10 mM; pH=7.6, Azul de Bromofenol 0.03%, Xilen Cianol FF 0.03%, Glicerol 60% y EDTA 60 mM). Además se cargaron varios pozos con 2 µl de marcador GeneRuler™ de Fermentas (Maryland, EUA), de bajo peso molecular (100 pb) como control. Al finalizar la electroforesis de los productos de PCR, se tiñeron los geles con bromuro de etidio (10 µl de bromuro de etidio 10 mg/mL diluidos en 100 ml de H₂O bidestilada) durante 20 min. Una vez realizada la tinción, se le tomó una fotografía a cada uno para su posterior análisis.

Re-extracción de los ácidos nucleicos totales

En los primeros geles que se generaron, se observaron bandas de ADN poco definidas. Se creyó que esto podía deberse a contaminación del ADN con polisacáridos que muchas veces tienden a coprecipitar junto con éste e interfieren en los diferentes procesos. Por lo tanto, se decidió obtener un ADN más limpio a partir de la re-extracción de los ácidos nucleicos totales extraídos previamente con el método de Doyle & Doyle (1990). Para ello se utilizó el Wizard® Genomic DNA Purification Kit de PROMEGA (Wisconsin, EUA) (Anexo VI).

Análisis estadístico

Los patrones de bandas en los geles luego de la amplificación fueron muy distintos a los de *A. cherimola*, con la cual se compararon y se usó como control en las separaciones electroforéticas. Por lo tanto, para *A. purpurea* con los datos que se generaron en los geles, se tomó cada banda como un carácter independiente o locus y se hicieron matrices binarias de ausencia y presencia de bandas polimórficas en los 96 individuos, con cada uno de los imprimadores utilizados.

Para medir la diversidad genética dentro de los sitios de recolecta de *A. purpurea*, se determinó el número total de fragmentos o bandas de ADN y sus frecuencias, así como la proporción y el porcentaje de fragmentos polimórficos. Además, se estimaron los parámetros de diversidad genética de Nei (1973) y las distancias genéticas de Nei (1978) entre pares de sitios. Se obtuvo el índice de diversidad de Nei (Nei 1973) y el índice de diversidad de Shannon (Shannon & Weaver 1949). Las frecuencias e índices de diversidad se calcularon en el programa POPGENE ver 1.32 (Yeh *et al.* 2000).

Se realizó un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para determinar el porcentaje de variación dentro y entre los sitios, utilizando el programa GenAlEx ver 6.0 (Peakall & Smouse 2006). Además, con este mismo programa, y a partir de las distancias genéticas de los individuos, se hizo un análisis de coordenadas principales (PCoA), y una estimación de la correlación entre los individuos, a partir de las distancias genéticas y geográficas. La prueba de Mantel (1967) permitió determinar si había una correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica de los individuos en los diferentes sitios, y evaluar si existía un aislamiento de los individuos por sitio debido a las distancias geográficas.

Por otra parte, se utilizó el programa Spatial Genetic Software ver 1.0c (Degen 2001a) para un análisis de estructura espacial de *A. purpurea* mediante una autocorrelación espacial entre los individuos de cada sitio. Se estimó la distancia promedio de Tanimoto y con ello se crearon distogramas para una mejor visualización de la estructura genética espacial dentro de cada sitio. Los datos obtenidos del análisis, se graficaron con el

programa Systat® ver 11.0 (Systat Software Inc., California, EUA). En cada distograma se establecieron 10 clases con rangos de distancias geográficas de 96 m y se obtuvo la distancia promedio de Tanimoto (distancia genética) observada para cada clase, así como el límite inferior y superior del intervalo de confianza de 99% para cada clase, con 500 permutaciones. Si los valores observados eran mayores al límite superior del intervalo de confianza de 99%, la estructura genética espacial era significativamente positiva, con individuos dentro de una clase, genéticamente más cercanos a lo esperado por azar. Si por el contrario los valores eran menores al límite inferior del intervalo, la estructura genética espacial era significativamente negativa, con individuos dentro de una clase más distantes a lo esperado por azar. Con este mismo programa se calculó el índice de agregación de los individuos para determinar la distribución espacial de los árboles en cada sitio.

Por último se hicieron análisis de agrupamiento y se construyeron dendrogramas a partir de la matriz de distancias genéticas de Nei (1978), calculada con base en las frecuencias alélicas, y mediante UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean) (Sokal & Michener, 1958). Los dendrogramas se obtuvieron por medio del programa PAUP ver 4.0 Beta (Swofford 2002).

CAPÍTULO IV

4.1 Resultados

Se analizaron muestras de 39 individuos de Santa Rosa, 45 de Nicoya y 12 de la Península de Osa. De los seis imprimadores SSR evaluados se eliminó el LMCH8 debido a la baja reproducibilidad de las bandas. Se hicieron análisis con lo que amplificaron los otros cinco imprimadores: LMCH2, LMCH5, LMCH6, LMCH9 y LMCH14 (Anexo III). Estos cinco imprimadores produjeron 22 bandas polimórficas (fragmentos de ADN) entre los 96 individuos analizados.

De acuerdo con los análisis de diversidad genética, Osa mostró mayor porcentaje de bandas polimórficas que los otros dos sitios con 77.27% y Santa Rosa obtuvo el menor porcentaje de fragmentos polimórficos con 50%. Asimismo Osa presentó los índices de diversidad de Nei (Nei 1973) y Shannon (Shannon & Weaver 1949) más altos, mientras que Santa Rosa mostró los valores más bajos (Cuadro 1). En todos los sitios el índice de diversidad de Shannon (Shannon & Weaver 1949) fue más alto que el de diversidad de Nei (Nei 1973) (Cuadro 1).

El Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) (basado en 99 permutaciones) mostró que existe mayor variación genética dentro de los sitios que entre éstos (Cuadro 2). Según el valor de phi estándar (Φ_{ST}) = 0.2720, $P=0.01$), la divergencia entre las zonas estudiadas es baja, con sólo 27% de la variación distribuida entre ellas.

En cuanto al índice de agregación (R), todos los sitios mostraron valores menores a uno ($R < 1$), lo que indica que la distribución de los árboles de *A. purpurea* en estos tres sitios es agregada y no al azar. El índice de agregación para Santa Rosa, Nicoya y Osa fue de 0.472, 0.416 y 0.751 respectivamente.

La prueba de Mantel (basada en 99 permutaciones) sugiere que en Santa Rosa y Nicoya no existe correlación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas, mientras que Osa sí mostró una correlación significativa ($r^2=0.4709$, $P=0.01$). Este resultado sugiere que no existe aislamiento por distancia de los individuos recolectados en los dos primeros sitios pero sí en Osa (Cuadro 3).

Según el análisis de estructura espacial utilizando la distancia de Tanimoto, no se obtuvo una autocorrelación espacial significativa en ningún sitio. En el Anexo VII se muestra el distograma de Santa Rosa como ejemplo, en donde se observa que no existe una autocorrelación espacial positiva ni negativa que muestre una tendencia de los individuos a ser genéticamente más distantes o similares a lo esperado por azar. Los valores de la distancia promedio de Tanimoto para Santa Rosa, Nicoya y Osa fueron 0.2998, 0.5704 y 0.5754 respectivamente.

El Análisis de Coordenadas Principales (mediante covarianza no estandarizada), mostró el agrupamiento de todos los individuos de las tres zonas de muestreo. Algunos individuos de Osa se mezclaron con los de Santa Rosa mientras que otros se asociaron más con los de Nicoya (Fig.1). Por ejemplo, PO 93 se ubicó cerca de Ni 55, mientras que PO 95 se relacionó con Ni 57, SR 33 y otras muestras de Santa Rosa. De la misma manera, PO 94 se localizó junto a SR 20 y SR 16, mientras que PO 4 agrupó con SR 28 y SR 33, y PO 5 con SR 29. Por su parte, PO 90, 91 y 92 agruparon cerca de Ni 49. También, se observa que algunas muestras de Nicoya y de Santa Rosa se mezclaron entre ellas, como por ejemplo Ni 52 que se asoció con SR 12 y SR 22. El resto de los individuos se agruparon en sus respectivas zonas. En general, lo que se obtuvo fue una concordancia relativa con lo observado en el dendrograma según los sitios de recolecta (Fig.2) y en el dendrograma de agrupamiento de los individuos por separado (Fig.3). Estos análisis de agrupamiento muestran que tanto Osa como Santa Rosa se encuentran a la misma distancia genética de Nicoya (Fig.2), y que algunos individuos de Osa son genéticamente más cercanos a los de Santa Rosa que a los del resto de la Península. Por su parte también se observa que el resto de individuos de Osa están más relacionados a los de Nicoya. Las distancias genéticas de Nei (1978) calculadas entre pares de sitios variaron entre 0.0893 y 0.2110 (Anexo IX). El análisis de agrupamiento de todos los árboles de *A. purpurea*, al igual que el PCoA, no logró separarlos bien por sitio y algunos individuos de Nicoya (Ni 49, Ni 55) se agruparon con individuos de la Península de Osa (PO 93), mientras que otros (Ni 57, Ni 52, Ni 87, Ni 47, Ni 56, Ni 86) se mezclaron con los de Santa Rosa (Fig.3). De igual forma, muestras de Santa Rosa y Osa agruparon entre ellas. Las muestras PO 01 a PO 05 pertenecen a Cabo

Matapalo, mientras que PO 90 a PO 95 pertenecen al Refugio de Vida Silvestre Preciosa Platanares y PO 96 corresponde a la única muestra de Bahía Drake. Algunas muestras de Santa Rosa (SR 28, SR 24, 35 y 18, SR 10) se relacionaron con las de Matapalo (PO 04, PO 05, PO 01 a PO 03, respectivamente). De éstas, PO 01, 02 y 03 formaron un grupo con SR 10 de Santa Rosa, y juntas estas cuatro muestras agruparon con la de Bahía Drake (PO 96). La asociación que formaron esos tres individuos de Matapalo con el SR 10 tuvo un valor medio de reemplazo (70%) mientras que la que se formó entre éstos últimos cuatro individuos (PO 01 a PO 03 y SR 10) con PO 96 obtuvo un bajo valor de reemplazo (35%), lo que indica que la muestra de Bahía Drake está menos relacionada con esos individuos. Con respecto a las muestras del Refugio de Vida Silvestre Preciosa Platanares (PO 90 a PO 95), PO 90, 91 y 92 formaron un grupo, mientras que PO 94 y 95 formaron otro. Estas primeras tres muestras quedaron en una rama debajo de la que se formó entre PO 94 y PO 95. La excepción fue la muestra PO 93 que se asoció aparte, formando un grupo con las muestras Ni 49 y Ni 55 de Nicoya. Juntos, estos tres individuos se asociaron a PO 90, 91 y 92 formando una rama más grande. Estos árboles no agruparon con el resto de la Península de Osa ni con los de Santa Rosa, lo que indica que son más similares a los de esa otra zona de Guanacaste. En general, la mayoría de los agrupamientos del dendrograma obtuvieron muy bajos valores de reemplazo lo que indica que no es un análisis tan robusto.

Se hicieron todos los análisis incluyendo y excluyendo la muestra de Bahía Drake en las pruebas estadísticas y se obtuvieron resultados similares por lo que se incluyó ese individuo en todos los análisis.

Cuadro 1. Proporción de fragmentos polimórficos, índice de diversidad de Nei (1973) e índice de diversidad de Shannon (Shannon & Weaver 1949) para 22 marcadores polimórficos en los 96 individuos de *Annona purpurea*.

Sitio	N	Proporción fragmentos polimórficos	% loci polimórficos	Índice Nei (Desv.Est)	Índice Shannon (Desv.Est)
Santa Rosa	39	11 de 22	50	0.1002 (0.1417)	0.1663 (0.2184)
Nicoya	45	16/22	72.73	0.2566 (0.1992)	0.3814 (0.2833)
Osa	12	17/22	77.27	0.2661 (0.1928)	0.3996 (0.2658)
Total	96	22/22	100	0.2684 (0.1698)	0.4161 (0.2198)

N=número de individuos; Desv.Est=desviación estándar.

Cuadro 2. Análisis de varianza molecular (AMOVA) dentro y entre los tres sitios de recolecta de *A. purpurea*.

Fuente de variación	gl	SDC	MDC	Var.Est.	%Var	Φ Est.	Prob
Entre sitios	2	79.671	39.836	1.266	27%	0.2720	0.01
Dentro de sitios	93	315.204	3.389	3.389	73%		

gl=grados de libertad, SDC= suma de la desviación al cuadrado, MDC=media de la desviación al cuadrado,

Var.Est.=variación estándar., %Var=Porcentaje de variación, Φ Est.=Phi estándar, Prob=probabilidad

Cuadro 3. Correlación (r^2) entre distancia genética y distancia geográfica utilizando la prueba de Mantel (1967) para los tres sitios de recolecta de *A. purpurea*.

Población	r^2	P
Santa Rosa	0.0217	0.020
Nicoya	0.0242	0.010
Osa	0.4709	0.010
Todos los sitios	0.0345	0.020

P=probabilidad

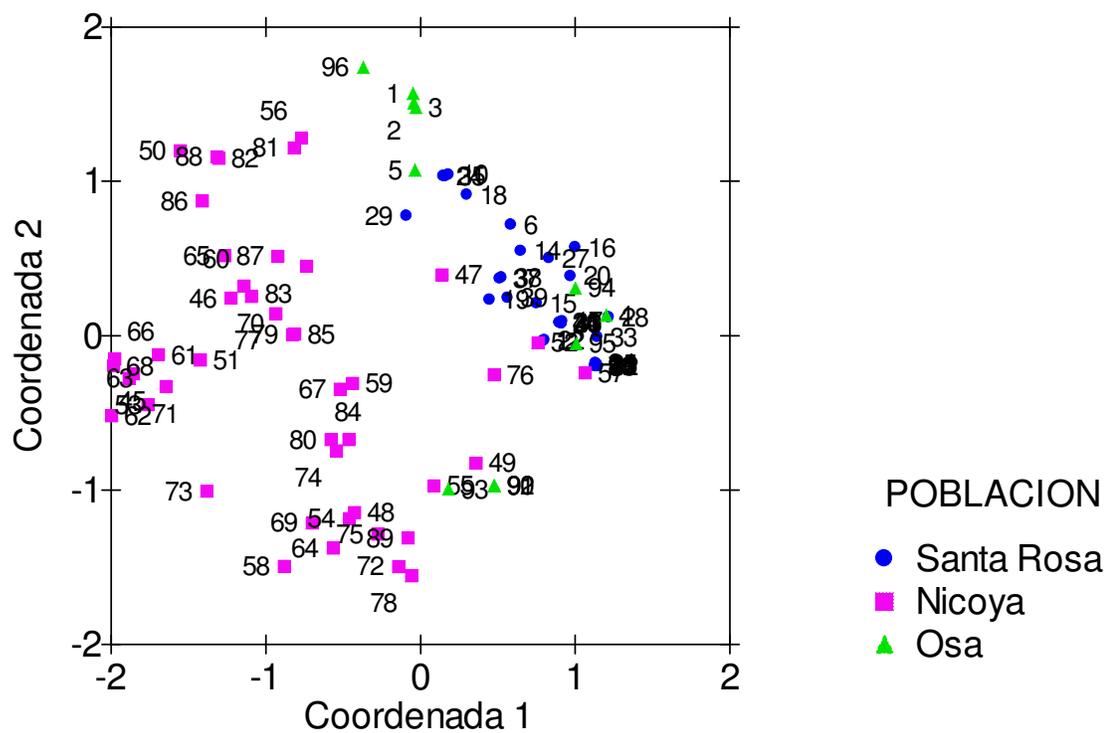


Fig.1. Análisis de Coordenadas Principales de la variación de microsatélites en *A. purpurea*. Se incluyen los 96 individuos analizados.

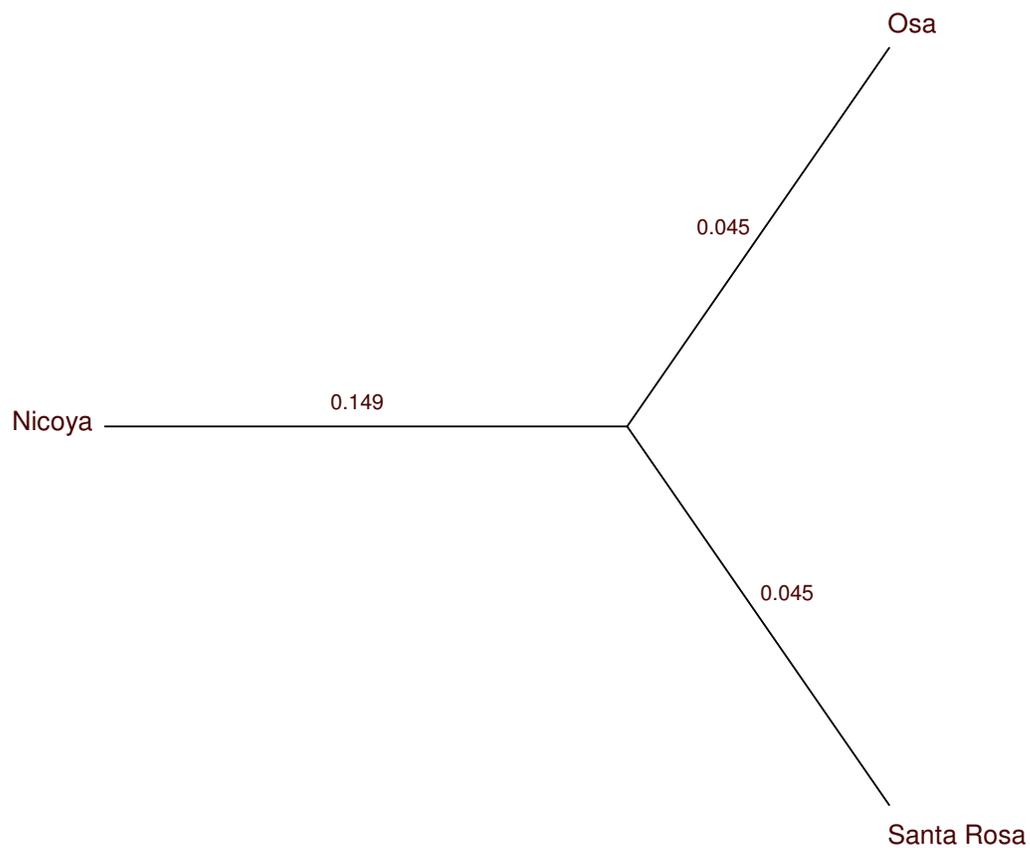


Fig.2. Dendrograma de *A. purpurea* basado en las distancias genéticas de Nei (1978) entre los sitios de recolecta y obtenido mediante UPGMA con 100 valores de reemplazo. Los valores de las ramas representan las distancias genéticas entre los sitios.

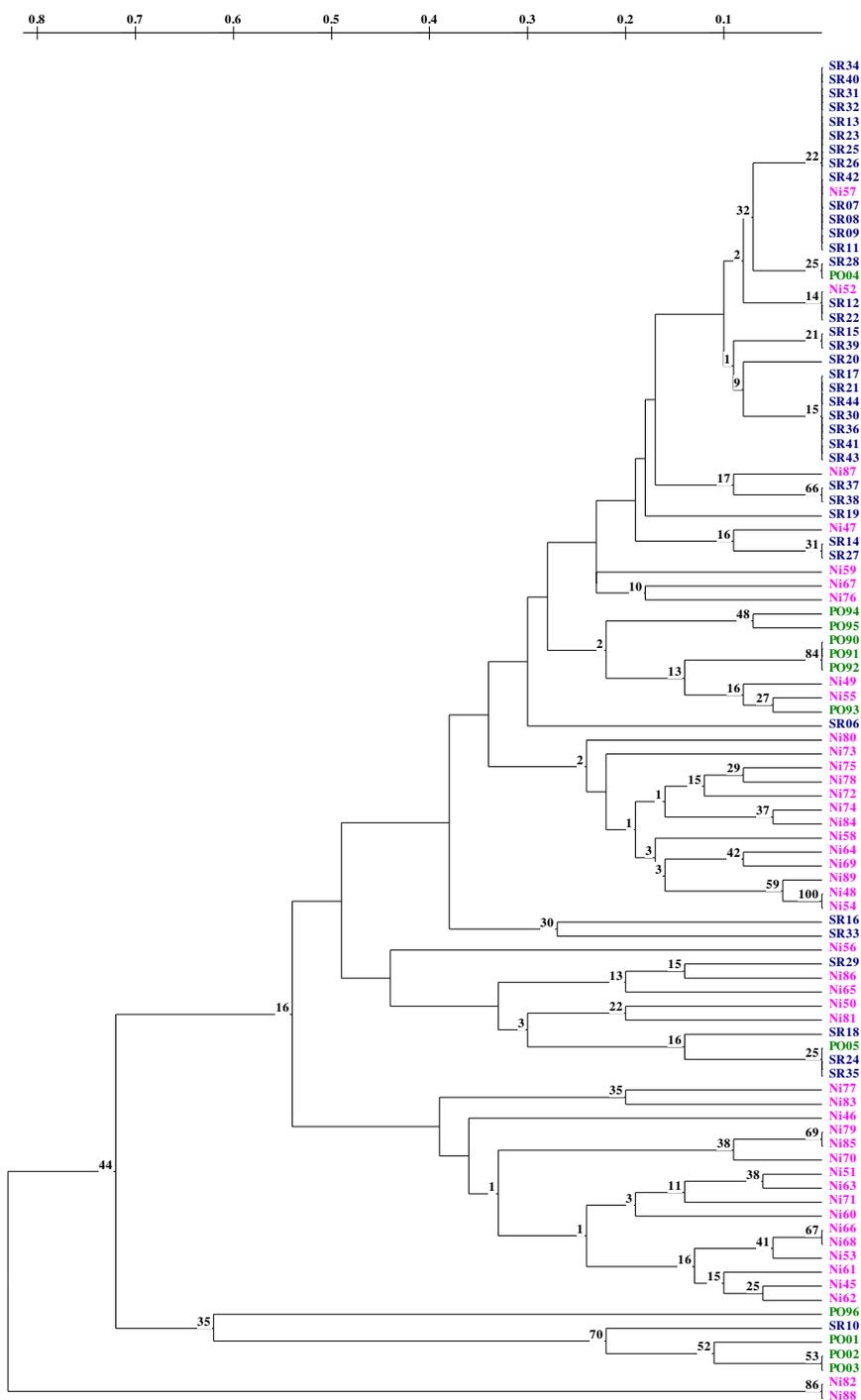


Fig.3. Dendrograma de *A. purpurea* basado en las distancias genéticas de Nei (1978) entre los 96 individuos analizados y obtenido mediante UPGMA con 100 valores de reemplazo. Los individuos están identificados con el número de recolecta y el nombre abreviado de cada sitio de recolecta: SR (Santa Rosa), Ni (Nicoya) y PO (Península de Osa). Los valores a la izquierda de las ramas representan los valores de reemplazo.

CAPÍTULO V

5.1 Discusión

Los resultados de *A. purpurea* obtenidos en los geles de agarosa TopVision™ LE GQ (Fermentas, Maryland, EUA) fueron diferentes a lo esperado en cuanto a los patrones de bandas observados en *A. cherimola*. Los datos obtenidos en este estudio mostraron más bandas de las descritas por Escribano *et al.* (2004). Lo anterior es producto de la amplificación no selectiva, un fenómeno muy común cuando se amplifican microsatélites en especies diferentes a la especie para la cual se diseñaron los imprimadores, debido a la transferencia y especificidad de los mismos. La transferibilidad de los microsatélites entre especies relacionadas es consecuencia de la homología de las secuencias de ADN en las regiones flanqueantes (Zucchi *et al.* 2003). En este estudio se utilizaron seis pares de imprimadores diseñados para *A. cherimola* y se observó que a pesar de que ambas especies pertenecen a un mismo género los resultados de la amplificación fueron muy diferentes. Esto sugiere que para Soncoya, los imprimadores utilizados no son tan informativos como sí lo fueron para otras especies de la familia Annonaceae analizadas por Escribano y colaboradores (2004). Otra prueba de ello es que sólo se pudieron hacer análisis con lo que amplificaron cinco de los seis imprimadores que se utilizaron en este estudio. El éxito en la transferibilidad de los microsatélites también depende de la distancia evolutiva entre la especie para la cual fueron diseñados los imprimadores y la especie que se quiere estudiar utilizando dichas secuencias (Kwapata *et al.* 2007). En el caso de *A. purpurea* y *A. cherimola*, se necesitan más estudios para definir que tan cercanas son estas dos especies. Otros estudios de árboles tropicales han demostrado alta transferibilidad de loci SSRs entre especies de árboles relacionadas e incluso entre especies de géneros diferentes (Dayanandan *et al.* 1997, Arnold *et al.* 2002, Zucchi *et al.* 2003, Escribano *et al.* 2004, Mix *et al.* 2004, Schnell *et al.* 2005, Kwapata *et al.* 2007, Escribano *et al.* 2008b). Los microsatélites utilizados en este estudio fueron seleccionados por mostrar productos de amplificación en cinco especies y dos cultivares de la familia Annonaceae (Escribano *et al.* 2004). Según Barbará y colaboradores (2007), hay mayor éxito en la transferencia de

microsatélites entre especies cuando éstas tienen tiempos de generación largos (especies perennes), sistemas de reproducción mixtos o exocruzamiento, y cuando el tamaño del genoma en la especie blanco es más pequeño que el de la especie fuente. La moderada a baja transferibilidad de microsatélites de *A. cherimola* a *A. purpurea* puede deberse principalmente a diferencias en el tamaño del genoma, uno de los factores descritos por Barbará *et al.* (2007); los otros factores se cumplen para ambas especies. Se ignora el tamaño del genoma de *A. cherimola* o de *A. purpurea* pero ambas pertenecen a una familia con alrededor de 2300 especies y se podría especular que su variabilidad en cantidad de especies puede reflejar de manera similar una variación en el tamaño del genoma. Esto debido a que en especies del género *Annona* se ha encontrado variación en el tamaño del genoma que va desde 686 Mpb en *A. serica*, a 1.274 Mpb en *A. glabra*, una variación de casi el doble del genoma entre una especie y otra (Bennett *et al.* 2000). Para este estudio, debido a los resultados obtenidos, se tomaron los patrones de bandas de los microsatélites en *A. purpurea* como caracteres dominantes y no como codominantes.

Este es el primer estudio de diversidad genética en *A. purpurea* basado en el análisis de microsatélites en Costa Rica. Los análisis de diversidad mostraron que en Osa hay mayor diversidad genética en comparación con Nicoya y Santa Rosa (Cuadro 1). Esto podría deberse a que en la Península de Osa se recolectaron muestras de individuos de tres zonas diferentes, separadas hasta por 30 km (Cabo Matapalo, Refugio de Vida Silvestre Preciosa Platanares y Bahía Drake), mientras que en Nicoya y Santa Rosa éstas proceden de individuos ubicados en un mismo sitio (la Finca El Alto y el Parque Nacional Santa Rosa respectivamente), y separados una corta distancia. Debido a esto se podría suponer que esos tres sitios de Osa muestran mayor diversidad de hábitat, y la diversidad genética de los individuos de esas tres zonas de Osa se podrían estar sumando. Por otra parte, Lowe y colaboradores (2003) sugieren que la variación ambiental, como por ejemplo diferencias en la humedad del hábitat, pueden aumentar la diferenciación genética. En algunas especies de árboles tropicales, la variación en la diversidad genética en las poblaciones o sitios de estudio, se debe a ecotipos distintos con adaptaciones a diferentes microclimas (Chase *et al.* 1995, Cavers *et al.* 2003, Lowe *et al.* 2003). En caoba (*Swietenia macrophylla*) (Lowe *et*

al. 2003), en cedro (*Cedrela odorata*) (Cavers *et al.* 2003) y en laurel (*Cordia alliodora*) (Chase *et al.* 1995, Boshier & Lamb 1997), se ha observado que las poblaciones que ocupan hábitats secos muestran mayor diversidad y son más diferenciadas genéticamente que las que ocupan hábitats húmedos. Sin embargo para *A. purpurea* este no parece ser el caso debido a que el sitio que mostró mayor diversidad genética fue Osa, seguido de Nicoya que mostró valores de diversidad muy similares, a pesar de que ambas zonas poseen climas distintos. En el caso de Nicoya y Santa Rosa, todos los árboles de Soncoya pertenecen a bosque seco. En Osa, una de las zonas, Cabo Matapalo, pertenece a la Fila de la Carbonera cuyo microclima es similar al del Pacífico Seco (Guanacaste), mientras que las otras dos, el Refugio de Vida Silvestre Preciosa Platanares y Bahía Drake poseen el mismo clima que predomina en la Península (bosque muy húmedo). Por lo tanto, las diferencias observadas en los valores de diversidad en los tres sitios estudiados no se pueden explicar en función de las condiciones climáticas que se presentan en dichas zonas, con los datos que se tienen.

Algunos autores opinan que los niveles contrastantes de diversidad entre las poblaciones pueden ser producto del impacto reciente del ser humano, con poblaciones que han experimentado mayores disturbios presentando una diversidad genética reducida (Navarro *et al.* 2005). Esto se ha encontrado en poblaciones de *Swietenia macrophylla* (Gillies *et al.* 1999, Lowe *et al.* 2003), *Swietenia humilis* (White *et al.* 1999), *Cedrela odorata* (Cavers *et al.* 2003), *Carapa guianensis* (Hall 1994a) y *Lonchocarpus costaricensis* (Navarro *et al.* 2005), entre otras. En el caso de Santa Rosa, que mostró menor diversidad genética, es una zona constituida por una serie de hábitats y tipos de vegetación que han sufrido a lo largo de la historia la intervención significativa del hombre. Entre los disturbios que ha presentado la zona se encuentra la eliminación de bosque para el establecimiento de zonas de pastoreo para ganado vacuno, la corta selectiva de árboles, la fragmentación del terreno y quemas de pasto anuales para prevenir la invasión y colonización maderera. Sin embargo, desde que se estableció el Parque Nacional Santa Rosa (1971), ha habido un programa intensivo de control de incendios y esto ha dado como resultado un mosaico de bosques y vegetación con diferentes estadíos sucesionales que

difieren en tiempo o edad desde el último episodio de incendio. Por su parte, la finca El Alto en Nicoya a pesar de que es una zona intervenida y en recuperación, presentó niveles de diversidad similares a los de Osa lo que respalda la idea de que Santa Rosa podría ser la zona más perturbada de las tres y de ahí que mostrara menor diversidad genética. Sin embargo, Céspedes y colaboradores (2003) estudiaron la diversidad genética de individuos de *S. macrophylla* en cinco sitios sucesionales dentro del Parque Nacional Santa Rosa. Contrario a lo que se ha reportado en otros estudios con árboles tropicales, ellos encontraron que en los sitios sucesionales más jóvenes (sitios que presentaron disturbios más recientemente) esta especie mostró mayor número de alelos que en los de mayor edad y esto según ellos se debe a la pérdida de alelos en los bosques maduros. No obstante, concluyeron que la diversidad genética encontrada en esos sitios perturbados más recientemente se debe a que *S. macrophylla* en particular, es una especie que se ve favorecida con los disturbios debido a su capacidad de regeneración. En el caso de *A. purpurea*, se podría pensar que Osa posee mayor diversidad que los otros dos sitios por ser una zona más boscosa y menos intervenida por el hombre. Sin embargo, según Lowe y colaboradores (2003), para establecer ese tipo de asociación entre el nivel de disturbios y la diversidad genética que presenta una especie en determinado sitio, se necesita documentación más detallada sobre la intensidad de los disturbios, así como evaluar la diversidad entre pares de poblaciones o sitios antes y después de los impactos.

Los parámetros de variabilidad obtenidos en este estudio ($H_S=0.10-0.27$, $H_T=0.27$; $F_{ST}=0.23$) muestran una diversidad genética comparable con la de otras especies de árboles tropicales como *S. macrophylla* ($H_O=0.27-0.41$, $H_T=0.45$; $F_{ST}=0.12$ con RAPDs, Gillies *et al.* 1999 y $H_O=0.14-0.73$, $H_E=0.15-0.73$, $H_T=0.15$; $F_{ST}=0.24$ con SSRs, Lowe *et al.* 2003), *C. odorata* ($H_S=0.03-0.13$, $H_T=0.27$; con cpDNA y AFLPs, Cavers *et al.* 2003), *Eugenia dysenterica* ($H_O=0.25-0.60$, $H_E=0.28-0.67$; $F_{ST}=0.25$ con SSRs, Zucchi *et al.* 2003), *L. costaricensis*, especie endémica de Costa Rica y Nicaragua ($H_S=0.19-0.28$, $H_T=0.24$; $F_{ST}=0.12$ con cpDNA y AFLPs, Navarro *et al.* 2005), *Vochysia ferruginea* ($H_S=0.16-0.32$, $H_T=0.26$; $F_{ST}=0.15$ con cpDNA y AFLPs, Cavers *et al.* 2005a), *Dalbergia retusa* ($H_S=0.23$, $H_T=0.20$; $F_{ST}=0.12$ con AFLPs, Chavarría 2005), *Simarouba amara* ($H_O=0.12-0.75$,

$H_E=0.33-0.72$; con AFLPs y SSRs, Hardesty *et al.* 2005), *Santalum austrocaledonicum*, una especie tropical endémica insular de Nueva Caledonia ($H_O=0.01-0.75$, $H_E=0.03-0.79$; $F_{ST}=0.22$ con SSRs, Bottin *et al.* 2005) y *Hagenia abyssinica*, especie tropical endémica de las montañas de África ($H_S=0.21-0.35$, $H_T=0.40$; $G_{ST}=0.25$ con ISSRs, Feyissa *et al.* 2007) entre otros. Los resultados con diferentes tipos de marcadores genéticos (RAPDs, AFLPs, ISSRs y microsatélites o SSRs) han mostrado rangos similares de diversidad en especies de árboles tropicales (Nybom 2004). Sin embargo, algunos autores opinan que la comparación entre especies debe hacerse con precaución (Pither *et al.* 2003, Degen *et al.* 2004) debido al limitado número de loci analizados, y en el caso de los SSRs, debido también a posibles diferencias en la tasa de mutación entre los loci de los microsatélites, particularmente de di- y trinucleótidos (Degen *et al.* 2004). En cuanto a *Annona*, los niveles de diversidad encontrados en *A. purpurea* fueron también comparables con los obtenidos en *A. cherimola* por Escribano *et al.* (2004) ($H_O=0.04-0.96$, $H_{Opromedio}=0.43$; $H_E=0.12-0.76$, $H_{Epromedio}=0.49$), utilizando los mismos cinco imprimadores que se utilizaron en este estudio (LMCH2, LMCH5, LMCH6, LMCH9, LMCH14) y otros más. También es comparable con la diversidad encontrada por Kwapata *et al.* (2007) en la especie *Annona senegalensis* ($H_S=0.22-0.62$), utilizando el LMCH6 y otros tres imprimadores diseñados por Escribano y colaboradores (2004) para *A. cherimola* (LMCH1, LMCH4, LMCH11). Frecuentemente se ha visto que cuando los microsatélites son transferidos entre especies relacionadas, el nivel de diversidad puede disminuir. Esto junto con el bajo poder de resolución de los geles de agarosa que se utilizan en algunos estudios e incluso en éste, comparado con los de poliacrilamida, pueden también afectar los resultados (Lowe *et al.* 2003).

Los resultados obtenidos mediante el AMOVA mostraron que sólo el 27% ($P=0.01$) de la variación se encuentra entre los sitios, mientras que el 73% ($P=0.01$) se encuentra dentro de estos. Estos resultados de varianza molecular concuerdan con los obtenidos en estudios con otras especies de plantas silvestres (Gao 2005, Zaghoul *et al.* 2006) y árboles tropicales (Gillies *et al.* 1997, Schierenbeck *et al.* 1997, Gillies *et al.* 1999, White *et al.* 1999, Cavers *et al.* 2003, Lowe *et al.* 2003, Dutech *et al.* 2004, Chavarría 2005, Navarro *et al.* 2005, Adolfo 2007) utilizando microsatélites y otro tipo de marcadores como RAPDs,

AFLPs y aloenzimas. Además concuerdan con otras especies de árboles que al igual que *A. purpurea* presentan exocruzamiento (Schierenbeck *et al.* 1997, Lowe *et al.* 2003). Tal es el caso de *S. macrophylla*, de la cual se estudió la estructura genética y el flujo de genes en tres poblaciones de Costa Rica, y se encontró mayor diversidad dentro de las poblaciones (61.7% y 76%) que entre estas, utilizando tanto AFLPs como SSRs (Lowe *et al.* 2003). Schierenbeck *et al.* (1997) por su parte, habían estudiado la estructura y diversidad genética en cuatro especies de árboles tropicales en Costa Rica (*Inga thibaudiana*, *Protium glabrum*, *Dendropanax arboreus*, *Alchornea latifolia*) utilizando RAPDs, y encontraron que para las cuatro especies, la mayor variación se daba dentro de los sitios de estudio y no entre estos. Lo mismo se observó en el estudio de Cavers *et al.* (2003) con la especie *C. odorata*, en donde se estudiaron diez poblaciones en Costa Rica, utilizando ADN de cloroplastos (cpDNA) y AFLPs como marcadores. En otros estudios realizados con microsatélites específicamente, también se ha encontrado este patrón en la distribución de la diversidad genética. Tal es el caso de *S. humilis* (White *et al.* 1999) y *S. macrophylla* (Adolfo 2007), con 96.8% y 78% de la variación dentro de las poblaciones estudiadas respectivamente. De igual manera, Dutech y colaboradores (2004) encontraron mayor diversidad (91.10%) dentro que entre 17 poblaciones de *Vouacapoua americana* que estudiaron en la Guyana Francesa. En cuanto a las anonáceas, Flores y colaboradores (2000) estudiaron la diversidad genética de *Annona squamosa* en huertos familiares mayas de la Península de Yucatán. Se encontró un alto porcentaje de loci polimórficos, así como poca diferenciación entre las poblaciones y mayor variación dentro de estas. Con ello se llegó a la conclusión de que entre esas poblaciones de *A. squamosa* existía un alto flujo de genes. A la misma conclusión llegaron Kwapata y colaboradores (2007) después de estudiar nueve poblaciones de *A. senegalensis* en diferentes localidades de Malawi y encontrar mayor diversidad genética dentro que entre dichas poblaciones. Sin embargo, en el estudio de *A. squamosa* (Flores *et al.* 2000), los autores concluyeron que la estructura homogénea observada en las poblaciones debido al flujo de genes, a diferencia de lo que sucede en las poblaciones naturales, en este caso podía ser producto del manejo de los frutos por parte de las comunidades mayas.

Los datos de *A. purpurea* concuerdan con la observación general de que las especies leñosas, perennes y que presentan exocruzamiento mantienen la mayoría de su variación dentro de las poblaciones y no entre éstas (Hamrick *et al.* 1992, Gillies *et al.* 1999, Cavers *et al.* 2003, Nybom 2004, Kremer *et al.* 2005). Las especies de árboles se han caracterizado por una alta diversidad genética dentro de sus poblaciones y baja diferenciación entre estas (Pither *et al.* 2003, Dutech *et al.* 2004). Se cree que este patrón de variación es consecuencia de un gran tamaño efectivo de población y de un extenso flujo de genes (Hamrick *et al.* 1992). Sin embargo, algunos autores opinan que no está muy claro si este fenómeno es común en las especies neotropicales debido a que hay pocos estudios en bosques tropicales en donde se estudien poblaciones de árboles que se encuentren separadas por grandes distancias (Dutech *et al.* 2004). Un ejemplo de este tipo de estudios es el que se realizó con *S. macrophylla* (Lemes *et al.* 2003) en Brasil. Se estudió la estructura genética de siete poblaciones naturales a lo largo de la Amazonía Brasileña, que se encontraban separadas por 2100 km. En este caso sí se encontraron niveles significativos de diferenciación entre las poblaciones y se cree que esto se debe a la escala geográfica a la que se realizó el estudio. Algo similar se encontró en otro estudio de *S. macrophylla* (Novick *et al.* 2003) tomando en cuenta ocho poblaciones naturales distribuidas en seis países de Mesoamérica, en donde se mostró una moderada diferenciación genética entre ellas. No obstante, la existencia de mayor variación dentro que entre las poblaciones de una misma especie, sugiere la posibilidad de una alta heredabilidad (variación heredable) e indica la existencia de variabilidad genética aditiva disponible y por lo tanto una mayor habilidad para responder a la selección (Adolfo 2007).

Un fenómeno común que se ha observado en las especies de árboles neotropicales es la distribución agregada de individuos en conglomerados de baja densidad a escalas pequeñas (Dutech *et al.* 2004, Takeuchi *et al.* 2004, Hardesty *et al.* 2005). Se cree que esto podría producir un tamaño efectivo de población limitado y diversidad genética reducida, así como una diferenciación génica significativa entre las poblaciones (Dutech *et al.* 2004). En el caso de *A. purpurea*, mostró este patrón de distribución agregada pero poca diferenciación genética entre los sitios de muestreo. La dispersión limitada de semillas

contribuye en gran medida a los patrones de agregación de los individuos. (Hardesty *et al.* 2005). Sin embargo, la distribución agregada de individuos en una población también puede deberse a diferencias microambientales que favorecen dicha distribución (Degen *et al.* 2001b, Takeuchi *et al.* 2004, Ng *et al.* 2006). Los ecólogos genetistas han discutido la hipótesis de que la dispersión limitada de genes conlleva a la diferenciación genética dentro de una población continua (Takeuchi *et al.* 2004). La agregación de los individuos puede afectar el comportamiento de los polinizadores, provocando, dependiendo de la especie, endogamia o polinización entre los vecinos más cercanos, con lo que se promueve la estructura genética (Dick *et al.* 2003, Takeuchi *et al.* 2004). De esta manera, la presencia de fuertes conglomerados provoca cierto aumento en la autocorrelación espacial causada por la dispersión limitada de polen y semillas (Takeuchi *et al.* 2004). Sin embargo, Ng y colaboradores (2006) demostraron que si la dispersión de semillas es restringida pero el flujo de polen es extensivo se observa una agregación significativa pero no una estructura genética espacial. Esto se debe a que con un extenso flujo de polen, el árbol madre recibe polen de varios árboles parentales y como consecuencia produce semillas con diferentes genotipos. Todo esto en conjunto con el traslape de semillas de otros árboles madre vecinos, contribuyen a la ausencia de una estructura genética espacial.

Según Rocha y Aguilar (2001a), algunos autores han estudiado el movimiento de los insectos polinizadores en el bosque seco de Costa Rica, y han propuesto que éstos poseen la habilidad para dispersar polen ampliamente en los bosques tropicales debido a sus grandes rangos de forrajeo. Sin embargo, se ha visto que para algunas especies de árboles tropicales, la dispersión de polen y semillas ocurre predominantemente a pequeñas distancias (de pocos metros a unos cuantos kilómetros) (Dick *et al.* 2003, Lowe *et al.* 2003, Dutech *et al.* 2004). En las anonáceas, la polinización natural fue un misterio durante años. Debido a que no es fácil observar la acción de ciertos agentes polinizadores, se asumió que ésta se debía a la acción del viento, a las abejas o a que simplemente el polen caía sobre los estigmas. Hoy en día, se sabe que las flores de las anonáceas son protoginias y presentan sincronía en la floración, con lo que se evita hasta cierto punto la autopolinización. Además, se ha observado que la mayoría de las especies de la familia Annonaceae son

polinizadas por coleópteros, algunas por trips, chinches, y hay también reportes de cucarachas. Se cree que la polinización por moscas puede ocurrir, pero su evidencia es insuficiente. En el caso del género *Annona*, es llevada a cabo por coleópteros de las familias Nitidulidae, Curculionidae, Cucujidae, Staphylinidae, Anthicidae y Scarabaeidae. Las flores de las anonáceas pueden ser muy llamativas o poco vistosas, pero siempre despiden un aroma muy intenso con el fin de atraer polinizadores (Westerkamp & Gottsberger 2000, Peña 2003, Tsukada *et al.* 2005). No producen néctar, por lo tanto se cree que la recompensa en alimentación para los visitantes podría ser el consumo de los pétalos, la parte carnosa de las puntas de los estambres y exudaciones de los estigmas (Peña 2003). En Panamá se ha visto también que las semillas de *A. purpurea* son dispersadas por animales, principalmente monos que se alimentan de la pulpa de los frutos maduros (Condit & Pérez 2007).

El haber encontrado poca diferenciación entre los sitios de recolecta de *A. purpurea* (Cuadro 2) podría sugerir que existe flujo de genes entre los sitios. Además, la falta de correlación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas en el caso de Santa Rosa y Nicoya (Cuadro 3), y el valor de phi estándar obtenido (Cuadro 2) sugieren que hay poca estructura genética en esos sitios y que la dispersión de genes podría ser efectiva entre los sitios examinados. Sin embargo, debido a que los datos obtenidos en los genes no fueron los esperados y se tuvieron que tratar como datos dominantes, no fue posible determinar flujo de genes por medio de los análisis estadísticos. Además, para calcular la estructura genética en cada uno de los sitios se utilizó la distancia de Tanimoto. Este tipo de prueba se utiliza para analizar datos con marcadores dominantes, y en el caso de *A. purpurea* los resultados de los análisis con microsatélites actuaron como tales. Sin embargo, para hacer análisis robustos con marcadores dominantes se necesita incluir más individuos y mayor número de loci (Cavers *et al.* 2005b) que para análisis con marcadores codominantes, debido a que los primeros contienen menos información. Por lo tanto, aunque los datos de Soncoya se trataron como dominantes para hacer los análisis respectivos, el número de individuos y de loci examinados eran insuficientes. Debido a esto, el análisis con la distancia de Tanimoto no mostró una estructura genética espacial en ninguno de los sitios.

En algunos casos, la dispersión y polinización a grandes distancias puede explicar por qué no hay una estructura genética observada a nivel poblacional debido a que el flujo génico tiende a homogenizar dicha estructura (Flores *et al.* 2000). Sin embargo, en el caso de *A. purpurea* una posible explicación a la poca diferenciación genética entre los sitios de recolecta puede deberse más a factores históricos y no al actual flujo de genes entre los sitios. Para esta especie en Costa Rica, podría ser que no ha habido suficiente tiempo de divergencia, y que todos los individuos dentro de esos tres sitios forman parte de una sola población o metapoblación. Se ha visto que la estructura de metapoblación parece ser una vía eficiente para mantener la diversidad genética en las especies tropicales que muestran una distribución agregada (Caron *et al.* 2000).

Los procesos de fragmentación de los bosques pueden afectar los patrones de dispersión de polen y semillas provocando un aumento en la diferenciación entre las poblaciones debido al limitado flujo de genes (Hall *et al.* 1994b, Aldrich *et al.* 1998, Dayanandan *et al.* 1999, Fuchs *et al.* 2003, Cardoso *et al.* 2005, Lowe *et al.* 2005). Sin embargo, en algunos casos los procesos de fragmentación han ocurrido recientemente y por lo tanto, la diversidad genética de una especie en particular no se ha visto afectada aún (Collevatti *et al.* 2001, Céspedes *et al.* 2003, Lowe *et al.* 2005, Navarro 2005), y en otros casos, la fragmentación ha contribuido al flujo génico entre parches de bosque (White *et al.* 1999, Apsit *et al.* 2001, Rocha & Aguilar 2001a,b, White *et al.* 2002, Dick *et al.* 2003, Lowe *et al.* 2003, Lowe *et al.* 2005). Por lo tanto, otra posible explicación para el caso de *A. purpurea*, podría ser que no ha transcurrido suficiente tiempo para detectar cambios, con los microsatélites disponibles en este estudio, y la diferenciación entre los sitios examinados podría no ser detectable por la actual técnica.

La correlación significativa entre las distancias genéticas y geográficas que se encontró en Osa demuestra que hay aislamiento por distancia y por lo tanto los árboles más similares genéticamente se encuentran agrupados, y conforme aumenta la separación entre los individuos, disminuye la relación entre éstos en ese sitio y no así en Nicoya ni en Santa Rosa (Cuadro 3). Esto era de esperarse debido a que en Osa se recolectaron muestras de árboles de tres sitios diferentes, separados por distancias mayores (hasta 30 km entre un

lugar y otro) que las de los individuos dentro de Santa Rosa y Nicoya. Debido a esto, era de esperar que la prueba de Mantel diera significativa. En este caso, los resultados son un artefacto del muestreo.

Por su parte, el Análisis de Coordenadas Principales (Fig.1) mostró concordancia con lo observado en el dendrograma de los sitios de recolecta (Fig.2) y en el dendrograma de agrupamiento de los individuos por separado (Fig.3). Algunos habitantes de Osa indicaron que los árboles de *A. purpurea* que se encontraban en la zona de Matapalo fueron traídos por sus padres desde Guanacaste. Esta información se corrobora con la estrecha relación que se observó entre los individuos de Matapalo y algunos individuos de Santa Rosa, en los dos análisis de agrupamiento y el PCoA. De igual forma la estrecha relación que se observó entre las muestras de Preciosa Platanares y Nicoya podría sugerir que esos individuos de Osa podrían provenir de esta otra zona de Guanacaste, sin embargo no se dispone de dicha información precisa.

En general, las muestras procedentes de Santa Rosa se agruparon de forma más homogénea entre sus individuos que las de Nicoya. Por otra parte, la mayoría de los agrupamientos mostraron valores de reemplazo bajos. Esto implica que no se pueda establecer claramente la relación entre los individuos de *A. purpurea* en estos tres sitios estudiados. Se necesita incluir más individuos o más sitios con poblaciones silvestres de Soncoya para tratar de resolver este punto. Además, se podría utilizar otro tipo de marcadores moleculares para comparar estos resultados ya que para este tipo de análisis, los microsatélites utilizados aquí no lograron satisfacer el objetivo. Debido a la cantidad de loci analizados con los marcadores utilizados no se pueden hacer deducciones muy certeras sobre la relación que tienen los individuos en esos sitios.

CAPÍTULO VI

6.1. Conclusiones y Recomendaciones

Los resultados generados con los microsatélites de *A. cherimola* utilizados, permitieron evaluar la variabilidad genética de *A. purpurea* en Costa Rica. A pesar de que la información no pudo ser tratada como codominante, hubo transferencia de microsatélites entre especies relacionadas, y esto permitió estudiar la diversidad genética de esta especie. El uso de estos marcadores detectó mayor diversidad genética en Osa y mayor variación genética dentro que entre los sitios de estudio. Además, los análisis indicaron que los individuos de esta especie muestran una distribución agregada en los tres sitios. Por su parte, no hubo correlación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas en dos de los sitios examinados, lo que indica que sólo en Osa hay aislamiento por distancia de los individuos y esto se debe a que en ese sitio se recolectaron individuos de tres zonas diferentes. Los dendrogramas obtenidos mostraron el agrupamiento de todos los árboles de *A. purpurea* estudiados. Sin embargo, estos análisis de agrupamiento no lograron definir claramente la relación entre los mismos.

Este es un estudio preliminar que provee datos importantes sobre esta especie, sin embargo, se recomienda hacer un estudio más exhaustivo que incluya otros sitios donde se encuentren poblaciones naturales de *A. purpurea*. Se deberían hacer muestreos en zonas como Palo Verde, Cañas, Bagaces, Golfito, en donde se han reportado individuos de esta especie, así como otras zonas de clima seco, en busca de más árboles de Soncoya. Es recomendable estudiar más a fondo otros factores ecológicos que podrían estar jugando un papel importante en la diversidad y la estructura genética de esta especie, como por ejemplo agentes dispersores y polinizadores.

Para mejorar los resultados obtenidos en este estudio, se recomienda extender el número y probar otros pares de imprimadores desarrollados para *A. cherimola* por Escribano y colaboradores (2004, 2008), que amplifiquen con éxito y que sean informativos para *A. purpurea*.

La Península de Osa con el Parque Nacional Corcovado es considerado el ecosistema con la mayor biodiversidad de Costa Rica. Es actualmente uno de los ecosistemas más complejos del mundo, y su inventario de especies es apenas una pequeña muestra de la complejidad de estos ecosistemas. (Rosero *et al.* 2002). Por su parte, los análisis de diversidad mostraron que de las tres zonas estudiadas, Osa es la que presenta la mayor diversidad genética para la especie analizada. Es por todo esto que resulta de crucial importancia más estudios y una mejor protección y conservación de todos sus sitios.

Estudios como éste sobre diversidad genética, proveen información esencial sobre caracteres moleculares de una especie, que en conjunto con el estudio de factores ecológicos y caracteres cuantitativos, permiten desarrollar estrategias más efectivas y sensibles para la conservación o el manejo sostenible de los recursos genéticos.

Literatura citada

- Adolfo, J.G. 2007. Diversidad genética en poblaciones de *Swietenia macrophylla* (Meliaceae) en Costa Rica y Bolivia. Tesis Magister Scientiae, Turrialba, Costa Rica. 108 p.
- Aldrich, P.R., J.L. Hamrick, P. Chavarriaga & G. Kochert. 1998. Microsatellite analysis of demographic structure in fragmented populations of the tropical tree *Symphonia globulifera*. Mol. Ecol. 7: 933-944.
- Apsit, V.J., J.L. Hamrick & J.D. Nason. 2001. Breeding population size of a fragmented population of a Costa Rican dry forest tree species. The Am. Genet. Assoc. 92 415-420.
- Arnold, C., M. Rossetto, J. McNally & R.J. Henry. 2002. The application of SSRs characterized for grape (*Vitis vinifera*) to conservation studies in Vitaceae. Am. J. Bot. 89: 22-28.
- Balloux, F. & N. Lugon-Moulin. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellites markers. Mol. Ecol. 11: 155-165.
- Barbará, T. C. Palma-Silva, G.M. Paggi, F. Bered, M.F. Fay & C. Lexer. 2007. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potentials and limitations. Mol. Ecol. 16: 3759-3767.
- Bennett, M.D., P. Bhandol & I.J. Leitch. 2000. Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses-807 new estimates. Ann. Bot. 86: 859-909.
- Boshier, D.H. & A.T. Lamb. 1997. Mating system, population structure and gene flow. *Cordia alliodora* – genetics and tree improvement. Trop. For. Papers 36:29-36.

- Bottin, L., D. Verhaegen, J. Tassin, I. Olivieri, A. Vaillant & J.M. Bouvet. 2005. Genetic diversity and population structure of an insular tree, *Santalum austrocaledonicum* in New Caledonian archipelago. *Mol. Ecol.* 14: 1979-1989.
- Caetano-Anollés, G. & P.M. Gresshoff. 1994. Staining nucleic acids with silver: an alternative to radioisotopic and fluorescent labeling. *Promega Notes* 45: 13-20.
- Cardoso S.R.S., J. Provan, C.D.F. Lira, L.D.O.R. Pereira, P.C.G Ferreira & M.A. Cardoso. 2005. High levels of genetic structuring as a result of population fragmentation in the tropical tree species *Caesalpinia echinata* Lam. *Biod. and Conser.* 14: 1047- 1057.
- Caron, H., S. Dumas, G. Marque, C. Messier, E. Bandou, R.J. Petit & A. Kremer. 2000. Spatial and temporal distribution of chloroplast DNA polymorphism in a tropical tree species. *Mol. Ecol.* 9:1089-1098.
- Cavers, S., C. Navarro & A.J. Lowe. 2003. A combination of molecular markers identifies evolutionary significant units in *Cedrela odorata* L. (Meliaceae) in Costa Rica. *Conserv. Genetics* 4: 571-580.
- Cavers, S., C. Navarro, P. Hopkins, R.A. Ennos & A.J. Lowe. 2005a. Regional and population-scale influences on genetic diversity partitioning within Costa Rican populations of the pioneer tree *Vochysia ferruginea* Mart. *Silvae Genetica* 54: 258-264.
- Cavers, S., B. Degen, H. Caron, M.R. Lemes, R. Margis, F. Salgueiro & A.J. Lowe. 2005b. Optimal sampling strategy for estimation of spatial genetic structure in tree populations. *Heredity* 95:281-289.

- Céspedes, M. M.V. Gutiérrez, N.M. Holbrook & O.J. Rocha. 2003. Restoration of genetic diversity in the dry forest tree *Swietenia macrophylla* (Meliaceae) after pasture abandonment in Costa Rica. *Mol. Ecol.* 12: 3201-3212.
- Chase, M.R., D.H. Boshier & K.S. Bawa. 1995. Population genetics of *Cordia alliodora* (Boraginaceae), a neotropical tree. 1. Genetic variation in natural populations. *Am. J. Bot.* 82: 468-475.
- Chavarría, A. 2005. Variación genética del árbol tropical en peligro de extinción *Dalbergia retusa* Hemsl. (Papilionaceae) en Costa Rica, utilizando el análisis de AFLP. Tesis Magister Scientiae, San José, Universidad de Costa Rica. 60 p.
- Collevatti, R.G., D. Grattapaglia & J.D. Hay. 2001. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. *Mol. Ecol.* 10: 349-356.
- Collevatti, R.G., D. Grattapaglia & J.D. Hay. 2003. Evidences for multiple maternal lineages of *Caryocar brasiliense* populations in the Brazilian Cerrado based on the analysis of chloroplast DNA sequences and microsatellite haplotype variation. *Mol. Ecol.* 12: 105-115.
- Condit, R. & R. Pérez. 2007. Árboles, arbustos y palmas de Panamá. Smithsonian Tropical Research Institute, Balboa, Ancón, Panamá. (Consultada: 6 de abril de 2008, <http://ctfs.si.edu/webatlas/maintreeatlas.html>)
- Creste, S., A. Tulmann Neto & A. Figueira. 2001. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Mol. Biol. Rep.* 19: 299-306.
- Cruz, E. & H. Deras. 2000a. Recolecta y establecimiento de anonáceas en El Salvador. *Agronomía Mesoamericana* 11: 91-95.

- Cruz, E. & H. Deras. 2000b. Recolecta de frutales tropicales en El Salvador. *Agronomía Mesoamericana* 11: 97-100.
- Dayanandan, S., K.S. Bawa & R. Kesseli. 1997. Conservation of microsatellites among tropical trees (Leguminosae). *Am. J. Bot.* 84: 1658-1663.
- Dayanandan, S., J. Dole, K. Bawa & R. Kesseli. 1999. Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). *Mol. Ecol.* 8: 1585-1592.
- Degen, B., R.J Petit & A. Kremer. 2001a. SGS ver 1.0 c—Spatial Genetic Software: a computer program for analysis of spatial genetic and phenotypic structures of individuals and populations. *J. Hered.* 92: 447-448.
- Degen, B., H. Caron, E. Bandou, L. Maggia, M.H. Chevallier, A. Leveau & A. Kremer. 2001b. Fine-scale spatial genetic structure of eight tropical tree species as analysed by RAPDs. *Heredity* 87: 497-507.
- Degen, B., E. Bandou & H. Caron. 2004. Limited pollen dispersal and biparental inbreeding in *Symphonia globulifera* in French Guiana. *Heredity* 93: 585-591.
- Dick, C.W., G. Etchelecu & F. Austerlitz. 2003. Pollen dispersal of tropical trees (*Dinizia excelsa*: Fabaceae) by native insects and African honeybees in pristine and fragmented Amazonian rainforest. *Mol. Ecol.* 12: 753-764.
- Doyle, J. & J. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Dutech, C., H.I. Joly & P. Jarne. 2004. Gene flow, historical population dynamics and genetic diversity within French Guianan populations of a rainforest tree species, *Vouacapoua Americana*. *Heredity* 92: 69-77.

- Ellegaard, K.M. 2005. Genetic Diversity in *Annona purpurea*. Bachelorproject at The Royal Veterinary and Agricultural University, Denmark/CIBCM, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 49 p.
- Escribano, P., M.A. Viruel & J.I. Hormaza. 2004. Characterization and cross-species amplification of microsatellite markers in cherimoya (*Annona cherimola* Mill., Annonaceae). *Mol. Ecol. Notes* 4: 746-748.
- Escribano, P., M.A. Viruel & J.I. Hormaza. 2008a. Comparison of different methods to construct a core germplasm collection in woody perennial species with simple sequence repeat markers: A case study in cherimoya (*Annona cherimola*, Annonaceae), an underutilised subtropical fruit tree species. *Ann. Appl. Biol.* (OnlineEarly Article, Published article online: 14 Mar 2008).
- Escribano, P., M.A. Viruel & J.I. Hormaza. 2008b. Development of 52 new Polymorphic SSR markers from cherimoya (*Annona cherimola* Mill.): transferability to related taxa and selection of a reduced set for DNA fingerprinting and diversity studies. *Mol. Ecol. Resources* 8: 317-321.
- Feyissa, T., H. Nybom, I.V. Bartish, & M. Welander. 2007. Analysis of genetic diversity in the endangered tropical tree species *Hagenia abyssinica* using ISSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54: 947-958.
- Flores, J.S., C.S. Gómez, & F. Vargas. 2000. Informe técnico final M065: Diversidad genética de *Annona squamosa* L. en huertos familiares mayas de la Península de Yucatán. Universidad Autónoma de Yucatán, Yucatán, México. 16 p. (también disponible en línea:
<http://www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/InfM065.pdf>)

- Fuchs, E.J., J.A. Lobo & M. Quesada. 2003. Effects of forest fragmentation and flowering phenology on the reproductive success and mating patterns of the tropical dry forest tree *Pachira quinata*. *Conserv. Biol.* 17: 149-157.
- Gao, L.Z. 2005. Microsatellite variation within and among populations of *Oryza officinalis* (Poaceae), an endangered wild rice from China. *Mol. Ecol.* 14: 4287-4297.
- Gentry, A.H. 1993. A field guide to the families and genera of woody plants of Northwest South America (Colombia, Ecuador, Peru), with supplementary notes on herbaceous taxa. The University of Chicago, Chicago, USA. 894 p.
- Gillies, A.C.M., J.P. Cornelius, A.C. Newton, C. Navarro, M. Hernández & J. Wilson. 1997. Genetic variation in Costa Rican populations of the tropical timber species *Cedrela odorata* L., assessed using RAPDs. *Mol. Ecol.* 6: 1133-1145.
- Gillies, A.C.M., C. Navarro, A.J. Lowe, A.C. Newton, M. Hernández, J. Wilson & J.P. Cornelius. 1999. Genetic diversity in Mesoamerican populations of mahogany (*Swietenia macrophylla*), assessed using RAPDs. *Heredity* 83: 722-732.
- Goldstein, D.B. & C. Schlötterer. 1999. Microsatellites: Evolution and applications. Oxford University, New York, USA. 352 p.
- Hall, P., L.C. Orrell, K.S. Bawa. 1994a. Genetic diversity and mating system in a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). *Am. J. Bot.* 81: 1104-1111.
- Hall, P., M.R. Chase & K.S. Bawa. 1994b. Low genetic variation but high population differentiation in a common tropical forest tree species. *Conserv. Biol.* 8: 471-482.

- Hamrick, J.L., M.J.W. God & S.L. Sherman-Broyles. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New For* 6: 95-124.
- Hardesty, B.D., C.W. Dick, A. Kremer, S. Hubbell & E. Bermingham. 2005. Spatial genetic structure of *Simarouba amara* Aubl. (Simaroubaceae), a dioecious, animal-dispersed Neotropical tree, on Barro Colorado Island, Panama. *Heredity* 95: 290-297.
- Janzen, D.H. 1986. Guanacaste National Park: Tropical, ecological and cultural restoration. UNED, San José, Costa Rica. 103 p.
- Janzen, D. H. 1991. *Historia Natural de Costa Rica*. Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 822 p.
- Janzen, D. H. 2004. Ecology of dry-forest wildland insects in the Área de Conservación Guanacaste, p. 80-96. *In* G.W. Frankie, A. Mata & S.B. Vinson (eds.). *Biodiversity conservation in Costa Rica: Learning the lessons in a seasonal dry forest*. University of California, California, USA.
- Jones, F.A. & S.P. Hubbell. 2006. Demographic spatial genetic structure of the Neotropical tree, *Jacaranda copaia*. *Mol. Ecol.* 15: 3205-3217.
- Kappelle, M., M. Castro, H. Acevedo, L. González, & H. Monge. 2003. *Ecosistemas del Área de Conservación Osa (ACOSA), Costa Rica*. Instituto Nacional de Biodiversidad. Santo Domingo de Heredia, Costa Rica. 496 p.
- Karp, A.O. Seberg & M. Buiatti. 1996. Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. *Ann. Bot.* 78: 143-149.

- Khalequzzaman, M. & S. Sultana. 2006. Insecticidal activity of *Annona squamosa* L. seed extracts against the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst). J. Bio-Sci. 4: 107-112.
- Kotkar, H.M., P.S. Mendki, S.V.G.S Sadan, S.R. Jha, S.M. Upasani, V.L. Maheshwari. 2002. Antimicrobial and pesticidal activity of partially purified flavonoids of *Annona squamosa*. Pest Manag. Sci. 58: 33-37.
- Kremer, A., H. Caron, S. Cavers., N. Colpaert, G. Gheysen, R. Gribel, M. Lemes, A.J. Lowe, R. Margis, C. Navarro, & F. Salgueiro. 2005. Monitoring genetic diversity in tropical trees with multilocus dominant markers. Heredity 95: 274-280.
- Kwapata, K., W.F. Mwase, J.M. Bokosi, M.B. Kwapata & P. Munyenembe. 2007. Genetic diversity of *Annona senegalensis* Pers. populations as revealed by simple sequence repeats (SSRs). Afr. J. Biotechnol. 6:1239-1247.
- Liaw, C.C., F.R. Chang, C.C. Wu, S.L. Chen, K.F. Bastow, K. Hayashi, H. Nozaki, K.H. Lee & Y.C. Wu. 2004. Nine new cytotoxic monoterahydrofuranic annonaceous acetogenins from *Annona montana*. Planta Medica 70: 948-959.
- Lowe, A.J., B. Jourde, P. Breyne, N. Colpaert, C. Navarro, J. Wilson & S. Cavers. 2003. Fine-scale genetic structure and gene flow within Costa Rican populations of mahogany (*Swietenia macrophylla*). Heredity 90: 268-275.
- Lowe, A., S. Harris & P. Ashton. 2004. Ecological Genetics: Design, analysis, and application. Blackwell, USA. 326 p.
- Lowe, A.J., D. Boshier, M. Ward, C.F.E. Bacles & C. Navarro. 2005. Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. Heredity 95: 255-273.

- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27: 209-220.
- Mix, C., P.F. Arens, N.J.Ouborg & M.J. Smulders. 2004. Isolation and characterization of highly polymorphic microsatellite markers in *Hypochoeris radicata* (Asteraceae). *Mol. Ecol. Notes* 4: 656-658.
- Morera, L., D.F. de Andrés, M. Barbancho, J.J. Garrido & C. J. Barba. 1999. Detección de variabilidad genética por microsatélites en el alano español. *Arch. Zootec.* 48: 63-70.
- Nason, J.D. 2002. La estructura genética de las poblaciones de árboles, p. 299-343. *In*: M.R. Guariguata & G. H. Kattan (eds.). *Ecología y conservación de bosques neotropicales*. Ediciones LUR, Cartago, Costa Rica.
- Navarro, C., S. Cavers, N. Colpaert, G. Hernández, P. Breyne & A.J. Lowe. 2005. Chloroplast and total genomic diversity in the endemic Costa Rican tree *Lonchocarpus costaricensis* (J. D. Smith) Pittier (Papilionaceae). *Silvae Genetica* 56: 293-300.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 3321-3323.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Ng, K.K.S., S.L. Lee, L.G. Saw, J.B Plotkin & C.L. Koh. 2006. Spatial structure and genetic diversity of three tropical tree species with different habitat preferences within a natural forest. *Tree Genetics & Genomes* 2: 121-131.

- Novick, R.R., C.W. Dick, M.R. Lemes, C. Navarro, A. Caccone & E. Bermingham. 2003. Genetic structure of Mesoamerican populations of Big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla*) inferred from microsatellites analysis. *Mol. Ecol.* 12: 2885-2893.
- Nybom, H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Mol. Ecol.* 13: 1143-1155.
- Orellana, A.D. & E. Martínez. 2002. Distribución geográfica de anonáceas en Guatemala. Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos (FAUSAC) & Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA). ICTA, Villanueva, Guatemala. 23 p. (también disponible en línea: <http://www.icta.gob.gt/fpdf>).
- Peakall, R. & P.E. Smouse. 2006. GenAIEx 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molec. Ecol. Notes* 6: 288-295.
- Peña, J.E. 2003. Insectos polinizadores de frutales tropicales: no sólo las abejas llevan la miel al panal. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)* 69: 6-20.
- Pinto, A.C. de Q., M.C.R. de Andrade, F.R. Ferreira, H.A. de C. Filgueiras, R.E. Alves & D.I. Kimpara. 2005. *Annona* species. International Centre for Underutilised Crops, University of Southampton, Southampton, UK. 284 p.
- Pither, R., J.S. Shore & M. Kellman. 2003. Genetic diversity of the tropical tree *Terminalia amazonia* (Combretaceae) in naturally fragmented populations. *Heredity* 91: 307-313.
- Rocha, O.J. & G. Aguilar. 2001a. Variation in the breeding behavior of the dry forest tree *Enterolobium cyclocarpum* (Guanacaste) in Costa Rica. *Am. J. Botany* 88: 1600-1606.

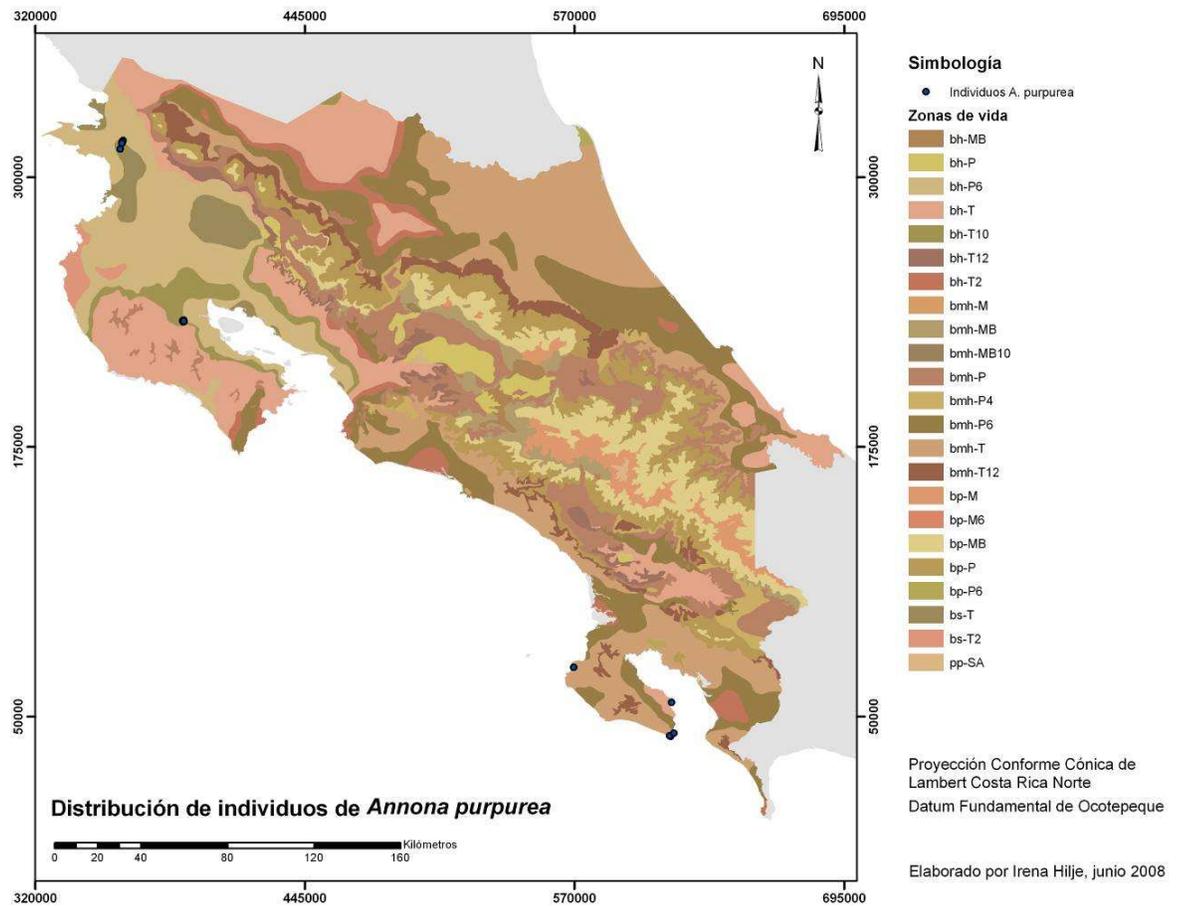
- Rocha, O.J. & G. Aguilar. 2001b. Reproductive biology of the dry forest tree *Enterolobium cyclocarpum* (Guanacaste) in Costa Rica: a comparison between trees left in pastures and trees in continuous forest. *Am. J. Bot.* 88:1607-1614.
- Rosero, L., T. Maldonado & R. Bonilla. 2002. Bosque y población en la Península de Osa, Costa Rica. *Rev. Biol. Trop* 50: 585-598.
- Schierenbeck, K.A., M. Skupski, D. Lieberman & M. Lieberman. 1997. Population structure and genetic diversity in four tropical tree species in Costa Rica. *Mol.Ecol.* 6: 137-144.
- Schnell, R.J., T. Olano, W.E. Quintanilla & A.W. Meerow. 2005. Isolation and characterization of 15 microsatellite loci from mango (*Mangifera indica* L.) and cross-species amplification in closely related taxa. *Mol. Ecol. Notes* 5: 625-627.
- Selkoe, K.A. & R.J. Toonen. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol. Letters* 9: 615-629.
- Shannon, C.E. & W. Weaver. 1949. The mathematical theory of communication. University of Illinois, Urbana, IL, EEUU. 144 p.
- Sokal, R.R. & C.D. Michener. 1958. A statistical method for evaluating systematic relationship. *Univ. Kansas Science Bulletin* 38: 1409-1438.
- Squirrell, J., P.M. Hollingsworth, M. Woodhead, J. Russell, A.J. Lowe, M. Gibby & W. Powell. 2003. How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants? *Mol. Ecol.* 12: 1339-1348.
- Swofford, D.L. 2002. PAUP ver 4.0 Beta: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Florida State University, USA.

- Takeuchi, Y., S. Ichikawa, A. Konuma, N. Tomaru, N. Niiyama, S.L. Lee, N. Muhammad & Y. Tsumura. 2004. Comparison of the fine-scale genetic structure of three dipterocarp species. *Heredity* 92: 323-328.
- Tsukada, M., H. Higuchi, T. Furukawa & A. Yoshida. 2005. Flower visitors to cherimoya, *Annona cherimola* (Magnoliales: Annonaceae) in Japan. *Appl. Entomol. Zool.* 40: 317-324.
- Westerkamp, C. & G. Gottsberger. 2000. Review & interpretation: Diversity pays in crop pollination. *Crop Sci.* 40: 1209-1222.
- White, G.M., D.H. Boshier & W. Powell. 1999. Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis* Zucc. *Mol. Ecol.* 8: 1899-1909.
- White, G.M., D.H. Boshier & W. Powell. 2002. Increased pollen flow counteracts fragmentation in a tropical dry forest: an example from *Swietenia humilis* Zuccarini. *PNAS* 99: 2038-2042.
- Yeh, F.C., R.C. Yang & T. Boyle. 2000. POPGENE ver 1.32. University of Alberta, Canada.
- Zaghloul, M.S., J.L. Hamrick, A.A. Moustafa, W.M. Kamel & R. El-Ghareeb. 2006. Genetic diversity within and among Sinai populations of three *Ballota* species (Lamiaceae). *J. Heredity.* 97: 45-54.
- Zamora, N. 1989. Flora arborescente de Costa Rica: especies de hojas simples. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 262 p.
- Zamora, N., Q. Jiménez & L.J. Poveda. 2000. Árboles de Costa Rica Vol. II. Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio), Heredia, Costa Rica. 374 p.

- Zhang, Y.H., H.Y. Peng, G.H. Xia, M.Y. Wang & Y. Han. 2004. Anticancer effect of two diterpenoid compounds isolated from *Annona glabra* Linn. *Acta Pharmacol. Sin.* 25: 937-942.
- Zucchi, M.I., R.V. Brondani, J.B. Pinheiro, L.J. Chaves, A.G. Coelho & R. Vencovsky. 2003. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. *Gen. Mol. Biol.* 26: 449-457.
- Zuñiga, T., J. Mejía & L. González. 2003. Memorias: I Congreso Mesoamericano de Áreas Protegidas. Comisión Centroamericana de Ambiente y Desarrollo (CCAD), Managua, Nicaragua. 174 p. (también disponible en línea: http://www.ccad.ws:9011/documentos/actividades_varias/1rcongresoap/memoria.pdf).

ANEXOS

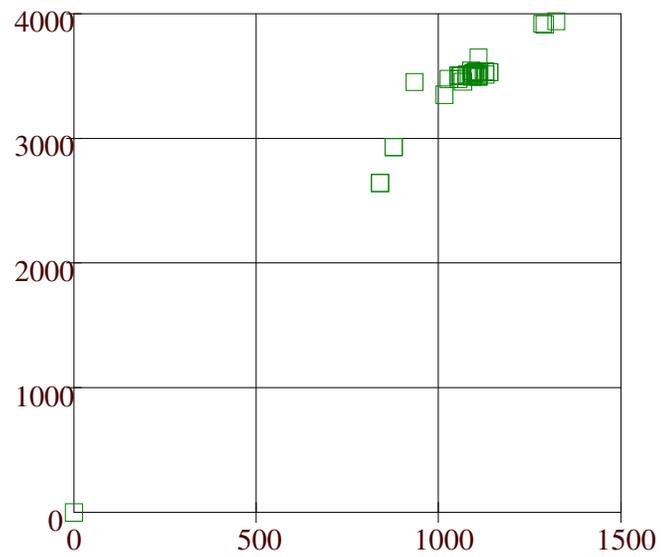
Anexo I

Mapa de ubicación de los individuos de *A. purpurea* analizados

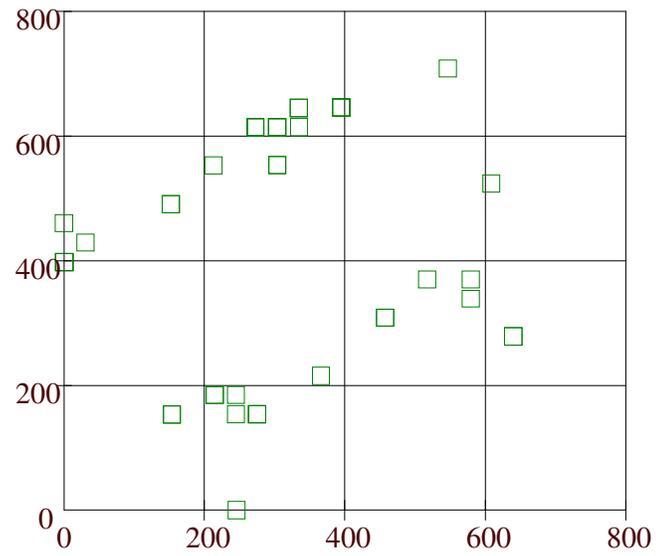
Anexo II

Distribución de los individuos de *A. purpurea* por sitio de muestreo

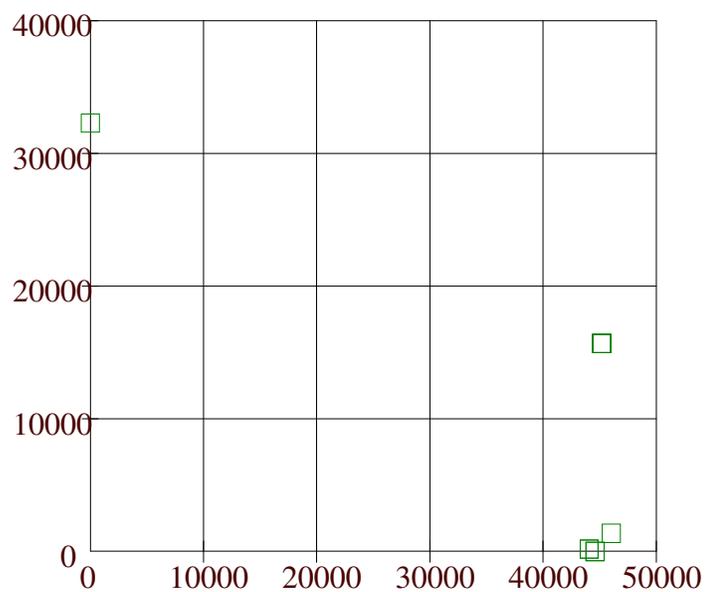
A) Distribución de los individuos de *A. purpurea* recolectados en Santa Rosa. Unidades en metros.



B) Distribución de los individuos de *A. purpurea* recolectados en Nicoya. Unidades en metros.



C) Distribución de los individuos de *A. purpurea* recolectados en la Península de Osa.
Unidades en metros.



Anexo III

Protocolo de extracción de ADN para *Annona purpurea* (Versión modificada de Doyle & Doyle 1990)

Reactivos y Materiales

Buffer de extracción 2X CTAB:

- Tris base 0.1 M pH 7.8
- EDTA 0.02 M pH 8.0
- NaCl 1.4 M
- CTAB 2%
- H₂O d.d.

(Mezcla: 10 ml Tris base 1 M, 4 ml EDTA 0.5 M, 30 ml NaCl 5M, 20 ml CTAB 10%, 36 ml H₂O d.d.)

PVP

DETC (C₅H₁₀NNaS₂·3H₂O)

2-mercaptoetanol (C₂H₆OS)

Cloroformo:octanol (24:1)

NaCl 5 M

Isopropanol

EtOH 70%.

H₂O d.d.

NaOAc 3 M pH=5.2

EtOH 100%

Tubos de teflón de 30 ml, autoclavados

Tubos Falcon plásticos de 15 ml, autoclavados

Tubos Eppendorf de 1.5 ml, autoclavados

Protocolo para extraer los ácidos nucleicos totales

- 1) Incubar el buffer 2X CTAB a 50°C.
- 2) Cortar 5x5 cm de material vegetal en pequeños pedazos y macerarlo rápidamente en un mortero.
- 3) Añadir 4 ml de buffer 2X CTAB y continuar macerando. Transferir el material a un tubo de teflón de 30 ml.
- 4) Añadir 3 ml de buffer 2X CTAB al mortero para lavar los restos de material y transferir al tubo de teflón.
- 5) Añadir una punta de espátula de PVP y otra de DETC.
- 6) Añadir 70 µl de 2-mercaptoetanol.
- 7) Incubar el tubo con el material a 50°C durante 40 min, agitando cada 10min.
- 8) Dejar enfriar la solución algunos minutos, añadir 4 ml de cloroformo-octanol. Abrir y cerrar el tubo varias veces para liberar gas, invertir suavemente el tubo por aproximadamente 1 min.
- 9) Centrifugar a 9000 rpm durante 40 min.
- 10) Recolectar la fase acuosa y transferirla a un tubo Falcon de 15 ml.
- 11) Añadir ½ vol. de NaCl 5 M e invertir.
- 12) Añadir 2/3 vol. de isopropanol y mezclar suavemente.
- 13) Colocar el tubo con la solución en hielo por unos minutos.
- 14) Recolectar el ADN con una punta cortada de micropipeta y transferir a un tubo Eppendorf. Remover todo el isopropanol posible.
- 15) Centifugar a 12000 rpm por 15 min.
- 16) Añadir 1 ml de EtOH 70% e incubar a 37°C durante 10 min para lavar el botón.
- 17) Descartar el EtOH 70%. Dejar secar el botón durante 3-5 min colocando el tubo hacia abajo sobre papel toalla.
- 18) Añadir 200-400 µl de H₂O d.d., e incubar a 37°C durante 15 min para resuspender el ADN.

Protocolo para separar el ADN de los ácidos nucleicos totales con RNasa

Reactivos y Materiales:

RNasa (10 µg/ml)

Cloroformo:alcohol isoamílico (24:1)

Fenol

H₂O d.d.

Tubos Eppendorf de 1.5 ml, autoclavados

- 1) Colocar 30 µl de H₂O d.d. en un tubo Eppendorf.
- 2) Añadir 1 µl de RNasa (10 µg/ml)
- 3) Añadir un alícuota de 40 µl del ADN resuspendido en agua y mezclar con una pipeta.
- 4) Incubar la solución a 37°C durante 30 min.
- 5) Añadir 10 µl de fenol y 10 µl de cloroformo-alcohol isoamílico e invertir suavemente el tubo por aproximadamente 1 min.
- 6) Recolectar la fase acuosa y transferirla a un nuevo tubo Eppendorf.

Anexo IV

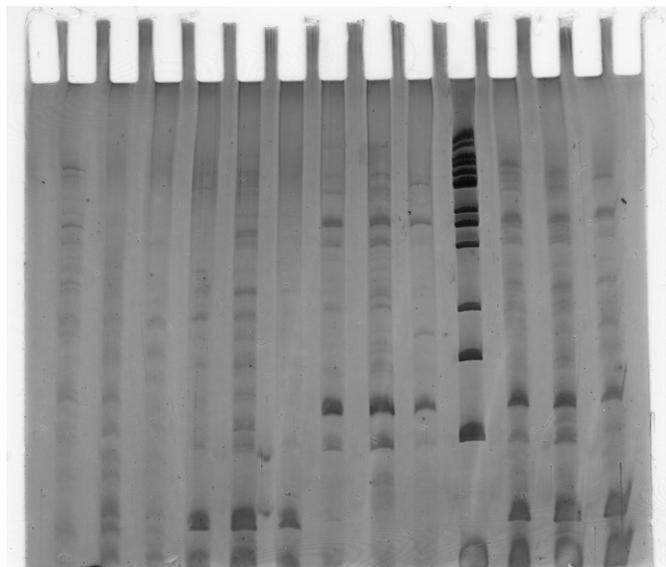
Imprimadores utilizados para amplificar microsatélites en *Annona purpurea*

(Tomados de Escribano *et al.* 2004)

Locus	Secuencia	Repetición
LMCH2 F:	5'-CAT TAA CAG AGC ATC AAA AT-3'	(CCT) ₅
LMCH2 R:	5'-AGA TTG AGA AGT CGT ACC TT-3'	
LMCH5 F:	5'-CCC ACT CTT CTA CCC TCA AC-3'	(CT) ₁₀
LMCH5 R:	5'-CAA GTC CCT GTA AGA ATC AGA-3'	
LMCH6 F:	5'-GGC ATC CTA TAT TCA GGT TT-3'	(CT) ₁₄
LMCH6 R:	5'-TTA AAC ATT TTG GAC AGA CC-3'	
LMCH8 F:	5'-AAT TAC GCA GAT CAC AGT AGC-3'	(GA) ₈
LMCH8 R:	5'-CAT CTT GCC TTG CTC TCT AC-3'	
LMCH9 F:	5'-TCA AAC ACG TAT AGA AAA CC-3'	(GA) ₆
LMCH9 R:	5'-TAT GTG AAA GAT CAA AAA GAG-3'	
LMCH14 F:	5'-GCT AAG TTC TAG TTT GCA GGT T-3'	(GA) ₈
LMCH14 R:	5'-CTC CCT CGA CAC TCT CTC TT-3'	

Anexo V

Gel de poliacrilamida 6%-7M Urea pequeño



Anexo VI

Composición de los geles de poliacrilamida 6%-7M Urea

Solución	Gel Pequeño	Gel Grande
Urea 7M	4.2 g	25.2 g
Acilamida-Bis (38:2)	1.4 ml	9.0 ml
Buffer TBE 10X para acilamida (secuenciación)	1.0 ml	6.0 ml
APS 10%	120 μ l	340 μ l
TEMED	12 μ l	34 μ l
Agua bidestilada hasta un volumen final de	10 ml	60 ml

Anexo VII

Protocolo de extracción de ADN utilizando el Wizard® Genomic DNA Purification Kit de PROMEGA (Wisconsin, EUA)

Reactivos y Materiales

Solución de Lisis Nuclear (Nuclei Lysis Solution)

Solución de Precipitación de Proteínas (Protein Precipitation Solution)

Solución de Rehidratación de ADN (DNA Rehydration Solution)

Isopropanol

EtOH 70%

Tubos Eppendorf de 1.5 ml, autoclavados

Protocolo para re-extraer los ácidos nucleicos totales

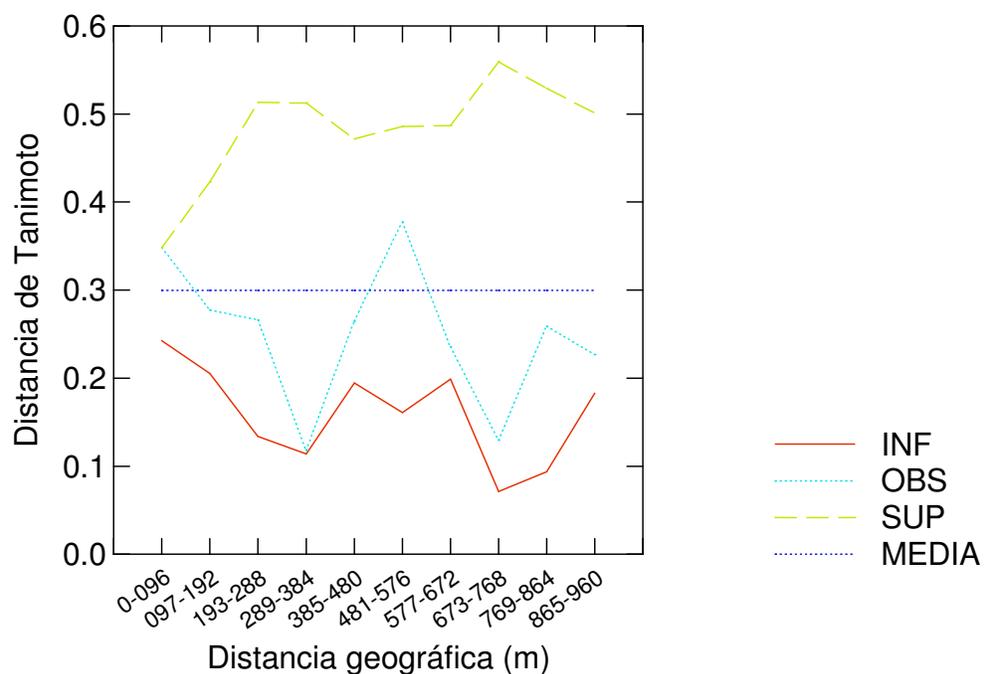
- 1) Tomar los ácidos nucleicos totales extraídos y agregar 1 vol de Solución de Lisis Nuclear.
- 2) Incubar a 37 °C durante 1 hora.
- 3) Agregar $\frac{1}{3}$ vol de Solución de Precipitación de Proteínas y agitar en el vortex por aprox. 20 min.
- 4) Centrifugar a 13.000-16.000 rpm por aprox. 10 min o más, hasta que se logre ver el botón.
- 5) Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf conteniendo 1 vol de isopropanol a temperatura ambiente.
- 6) Invertir los tubos hasta que aparezca el ADN precipitado.
- 7) Centrifugar 13.000-16.000 rpm por aprox. 5 min, hasta que aparezca el botón.
- 8) Descartar el sobrenadante cuidadosamente y agregar 1 vol de EtOH 70% a temperatura ambiente.
- 9) Invertir los tubos varias veces para lavar el botón.
- 10) Centrifugar 13.000-16.000 rpm por aprox. 5 min y aspirar cuidadosamente el

EtOH 70%.

- 11) Dejar secar el botón de 10 a 15 min.
- 12) Agregar $\frac{1}{3}$ vol. de Solución de Rehidratación de ADN e incubar a 65°C durante 1 hora, o dejar incubando toda la noche a 4°C.

Anexo VIII

Distograma basado en el análisis espacial de *A. purpurea* en Santa Rosa, utilizando la distancia de Tanimoto (distancia genética). Cada clase de distancia geográfica representa un rango de distancia de 96 m. La línea horizontal (media) representa el promedio de la distancia de Tanimoto. Las líneas externas representan el límite inferior (inf) y superior (sup) del intervalo de confianza de 99%. La línea de puntos (obs) representa los valores observados para cada clase de distancia.



Anexo IX

Distancias genéticas de Nei (Nei 1978) (no sesgadas) obtenidas entre los sitios de recolecta de *A. purpurea* y utilizadas para construir el dendrograma basado en UPGMA.

Población	1	2	3
1	****		
2	0.1754	****	
3	0.0893	0.2110	****