

Programa de pos-graduación en Genética

Tesis de Maestría

Evaluación de marcadores moleculares para el estudio poblacional de *Lecythis minor* Jacq. (Lecythidaceae)

Alfredo Navas Ramírez

Barraquilla (Atl), Colombia

2020

Universidad Simón Bolívar
Programa de pos-graduación en Genética

Evaluación de marcadores moleculares para el estudio poblacional de *Lecythis minor* Jacq. (Lecythidaceae)

Tesis presentada al Programa de Postgrado en Genética como requisito parcial para obtener el grado de Magister.

Alfredo Navas Ramírez

Tutora:

Bio. MSc. y PhD Yani Aranguren Díaz

Cotutor:

Mic. MSc. y PhD Elwi Machado Sierra

Barraquilla (Atl), Colombia

2020

Dedicatoria

Quiero dedicar esta tesis a mi abuela María De los santos, que en paz descanse, se que donde quiera que este está orgullosa de mí. A mis padres y a mis hermanos, quienes son mi motivo para salir adelante. A mi novia quien me ha motivado para poder cumplir este logro.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mis tutores de tesis Dra. Yani Aranguren y Dr. Elwi machado por brindarme la confianza para realizar este trabajo bajo su tutoría. Les quiero dar las gracias por su incalculable aporte a mi formación, por orientarme y por tenerme paciencia. Les estoy y les estaré siempre agradecido.

No quiero dejar pasar la oportunidad para agradecer a Protécnica Ingeniería y a Manuel Saenz por el apoyo económico y logístico brindado para las salidas de campo.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecer al profesor Antonio Bula por brindarme la oportunidad de participar en el proyecto con el cual pude financiar mi maestría.

Contenido

Lista de figuras.....	VI
Lista de tablas.....	VII
Resumen	VIII
Abstract	9
Introducción	10
1. Problema de Investigación.....	12
1.1 Planteamiento del Problema.....	12
1.2 Justificación	15
2. Objetivos	18
2.1 Objetivo General.....	18
2.2 Objetivos específicos	18
3. Marco Teórico	19
4. Diseño Metodológico	27
4.1 Tipo de Estudio	27
4.2 Área de Estudio.....	27
4.3 Toma de muestras	28
4.4 Fase de laboratorio	29
4.4.1 Extracción de ADN.....	29
4.5 Análisis de Datos.....	33
5. Resultados	34
5.1 ISSR	34
6. Discusión.....	40
7. Conclusiones y Recomendaciones	44
7.1 Conclusiones.....	44
7.2 Recomendaciones.....	44
8. Referencias Bibliográficas.....	44

Lista de figuras

Figura 1. Esquema de amplificación de marcadores ISSR	23
Figura 2. Áreas de muestreo	27
Figura 3. Ubicación geográfica de los individuos seleccionados para el estudio.....	30
Figura 4. Patron electroforético generado por ISSR Di(AG) ₈ C en 8 individuos de <i>L. minor</i>	35
Figura 5. Analisis de coordenadas principales (PCoA) generado a partir de ISSR.....	36
Figura 6. Patron electroforético generado por SSR Bex33 en 8 individuos de <i>L. minor</i>	37
Figura 7. Análisis de coordenadas principales (PCoA) generados a partir de SSR.....	38

Lista de tablas

Tabla 1.	Municipios muestreados por departamento de <i>Lecythis minor</i>	28
Tabla 2.	Marcadores ISSR probados en <i>L. minor</i>	31
Tabla 3.	Marcadores microsatélites probados en <i>Lecythis minor</i>	32
Tabla 4.	Lista de marcadores transferidos y no transferidos.....	34
Tabla 5.	Características de los marcadores ISSR en <i>Lecythis minor</i>	36
Tabla 6.	Características de los marcadores SSR en <i>Lecythis minor</i> :	38

Resumen

El bosque seco tropical (Bs-T) es un ecosistema importante para distintos grupos de organismos debido a su alta diversidad florística. Dentro de la amplia diversidad de especies vegetales del Bs-T se encuentra *Lecythis minor*, un árbol distribuido en el norte de Suramérica en Venezuela y Colombia. Esta especie poco estudiada está empezando a ser utilizada en procesos de reforestación y posee un potencial económico, debido a la comercialización del aceite rico en selenio orgánico que se encuentra en sus semillas. Por tanto, es necesario identificar marcadores moleculares que puedan ser utilizados para el estudio de la genética poblacional de *L. minor*. En este sentido, se planteó evaluar marcadores moleculares para el estudio poblacional de *L. minor*. Para ello se evaluó un set de marcadores ISSR y SSR, probando la transferibilidad de estos en *L. minor*. Teniendo como resultado 5 marcadores ISSR amplificados, los cuales generaron un total de 31 bandas, de las cuales 25 fueron polimórficas; mientras que de los 10 SSR probados se amplificaron 7, obteniendo un set de marcadores con un promedio de PIC de 0,447. Se obtuvo un set de 5 marcadores ISSR y 5 marcadores SSR informativos transferidos a la especie, convirtiéndose en una herramienta para futuros estudios en genética poblacional de *L. minor*.

Palabras clave: ISSR, SSR, diversidad genética, variabilidad genética.

Abstract

The tropical dry forest (Bs-T) is an important ecosystem for different groups of organisms due to its high floristic diversity. Within the wide diversity of plant species of Bs-T is *Lecythis minor*, a tree distributed in the north of South America in Venezuela and Colombia. This little-studied species is beginning to be used in reforestation processes and has economic potential, due to the commercialization of the oil rich in organic selenium found in its seeds. Therefore, it is necessary to identify molecular markers that can be used to study the population genetics of *L. minor*. In this sense, it was proposed to evaluate molecular markers for the population study of *L. minor*. For this, a set of ISSR and SSR markers was evaluated, testing their transferability in *L. minor*. Resulting in 5 amplified ISSR markers, which generated a total of 31 bands, of which 25 were polymorphic; While of the 10 SSRs tested, 7 were amplified, obtaining a set of markers with an average ICP of 0.447. A set of 5 ISSR markers and 5 informative SSR markers transferred to the species were obtained, becoming a tool for future studies in population genetics of *L. minor*.

Keywords: ISSR, SSR, genetic diversity, genetic variability.

Introducción

El bosque seco tropical (Bs-T) es un ecosistema importante para distintos grupos de organismos debido a su alta diversidad florística (1), se caracteriza por estar distribuido entre los 0 y 1000 metros de altura sobre el nivel del mar, con temperaturas superiores a 24°C, niveles de precipitación anual bajos (700-2000 mm) y uno o dos periodos de sequía al año (2). El Bs-T es considerado como un *hotspot* de diversidad, ya que alberga un alto número de grupos biológicos (3). Sin embargo, en la actualidad es uno de los ecosistemas más afectados debido a que se ha intensificado su uso para distintas actividades como la agricultura, ganadería, minería, turismo y el desarrollo urbano; y aunque no se conoce la cobertura original del Bs-T, se estima que solo se cuenta con un 8% de su cobertura (4,5). Sumado a lo anterior, de este ecosistema existen pocas investigaciones sobre sus cualidades y componentes (6), y donde hay más vacío de información es a nivel genético de plantas y microorganismos (7).

Dentro de la gran variedad de especies albergadas en el bosque seco se encuentran especies con potencial económico que se han visto afectadas por la reducción de este ecosistema, entre ellas se encuentra *Lecythis minor* (Lecythidaceae), conocido comúnmente como olla de mono, es una especie arbórea de hasta 25 metros de alto, poseen flores blancas las cuales tienen estambres amarillos; con frutos color pardo, los cuales tienen adheridas sus semillas con apéndice carnosos de color crema, estas son de color castaño. Crece por debajo de los 500 msnm en ambientes de bosque seco (8,9).

Las semillas de *L. minor* no son comestibles, ya que posee concentraciones de selenio que resultan ser tóxicas (10). Por su parte, el arilo es fuente de alimentación para la fauna silvestre como el mono titi (*Saguinus oedipus*), endémico de la región Caribe (11,12). Asimismo, por su facilidad de germinación, estructura del tronco y las excelentes condiciones de su madera, puede llegar a ser una especie valiosa en programas de reforestación (9). Es por tanto que el conocimiento de la estructura genética y los niveles de diversidad es un instrumento esencial para programas de mejoramiento y restauración de los hábitats (13).

La diversidad genética puede ser evaluada mediante el uso de marcadores moleculares, en especial los microsatélites, los cuales son altamente polimórficos; estos están definidos como segmentos cortos de ADN que se repiten en tándem dispersos por todo el genoma (14), los cuales se desarrollan principalmente mediante la construcción de bibliotecas genómicas enriquecidas con repeticiones de secuencias en tándem o mediante el uso de la genómica, identificando regiones microsatélites en las secuencias que reposan en las bases de datos mediante el uso de herramientas bioinformáticas (15,16), cuando no hay datos de secuencias disponibles, el desarrollo de marcadores microsatélites puede resultar muy costosos; por lo que la transferencia de SSR se ha convertido en una alternativa útil para el estudio de la genética poblacional de las plantas; esta es definida como la capacidad de encontrar un marcador genético de una especie en otra especie relacionada, esto debido a que gran parte de sus genomas (incluyendo las regiones microsatélites) se encuentran conservados (17).

A pesar de la existencia de reportes de estudios donde se evalúa la diversidad genética mediante el uso de microsatélites en especies de la familia Lecythidaceae (18–20), aun no se han realizado estudios de este tipo para *L. minor* y se desconoce el estado de conservación de la especie, por lo que se hace necesario identificar marcadores moleculares que puedan ser utilizados para el estudio de la genética poblacional de *L. minor*. Teniendo en cuenta la importancia ecológica, el potencial económico de esta especie y la falta de conocimiento sobre la misma, este estudio plantea evaluar marcadores moleculares para el estudio poblacional de *L. minor*.

1. Problema de Investigación

1.1 Planteamiento del Problema

Se estima que en Colombia gracias a la degradación y transformación, el bosque seco tropical (Bs-T) ha disminuido su cobertura a solo un 8% de su extensión original (5). Estos relictos se encuentran bastante fragmentados, siendo la fragmentación uno de los factores que en los últimos años más ha afectado la biodiversidad de este ecosistema (21), que es considerado un *hotspot* de diversidad, ya que alberga un alto número de grupos biológicos, pero la disminución del bosque llama a la necesidad de su protección (3,22). Una de las características resaltantes del Bs-T son las adaptaciones morfológicas y fisiológicas de sus especies a condiciones de sequía, lo que en un futuro los podría convertir en pilares para la conservación, debido principalmente a los problemas que se están presentando con el cambio climático (23,24).

El crecimiento económico a nivel mundial y local se ha basado en la sobreexplotación de los ecosistemas, lo que ha generado pérdida de cobertura vegetal y por consiguiente pérdida de la diversidad; como consecuencia de esto, gran parte del territorio nacional se encuentra en algún estado de degradación (25). La región Caribe es la zona más afectada directa e indirectamente desde el punto de vista de servicios ecosistémico (7,26,27), debido al aprovechamiento de las comunidades humanas que son parte del Bs-T se ven afectadas especies vegetales como el guasimo (*Guazuma ulmifolia*), algarrobo (*Hymenaea courbaril*), guaimaro (*Brosimum alicastrum*), palma amarga (*Sabal mauritiiiformis*), caracolí (*Anacardium excelsum*), camajon (*Sterculia apetala*), gusanero (*Astronium graveolens*), jobo (*Spondias mombin*), flor morado (*Handroanthus impetiginosus*), jaguito (*Genipa*

americana), caoba (*Swietenia macrophylla*), ceiba bruja (*Ceiba pentandra*), palma (*Attalea butyracea*) y olla de mono (*Lecythis minor*) entre otros (28).

Dentro la variedad de productos que puede brindar el BS-T tenemos la selenometionina extraída de *L. minor* (29), este seleno aminoácido es un oligoelemento esencial en la dieta humana, tiene participación en la defensa antioxidante, la homeostasis tiroidea y la regulación del estado redox; previene el riesgo de cáncer y los trastornos de la tiroides; y protege las neuronas, los músculos esqueléticos y cardíacos (30). Sin embargo, existe la problemática de las bajas concentraciones de selenio en los suelos (principalmente por la naturaleza del material parenteral) y por consiguiente en los cultivos, siendo insuficiente su presencia en muchos alimentos (31). Algunas especies como *L. minor* que son hiperacumuladores de selenio en sus semillas (29) presentan una alternativa nutracéutica para enfrentar esta problemática.

Por otra parte, la degradación y fragmentación actual del bosque seco está afectando seriamente los recursos genéticos de sus especies (32). La fragmentación del bosque tiene como consecuencia que el flujo genético entre relictos se vea restringido y ocurra un aumento de la endogamia (33), viéndose reducida la diversidad genética de las especies y repercutiendo en la capacidad de respuesta a cambios medio ambientales, lo que hace necesario conservar la biodiversidad del ecosistema (34).

Teniendo en cuenta todo esto, se propone evaluar marcadores moleculares para el estudio de *L. minor*, que permitirá caracterizar la estructura genética de las poblaciones, estimar su estado de conservación, seleccionar germoplasma para reforestación y aprovechar de forma sostenible sus productos no maderables. Así se planteó la siguiente pregunta de investigación ¿Cuáles marcadores moleculares pueden ser utilizados en *L. minor* para el estudio de su genética poblacional?

1.2 Justificación

Colombia es un país cuya geografía determina una mega diversidad biológica y ésta amplía el potencial de crecimiento y desarrollo sostenible del país. Para ello es necesario garantizar el uso eficiente de los recursos que permitan continuar obteniendo beneficios materiales, servicios ambientales y generar nuevas posibilidades sociales, culturales y económicas. La conservación de la biodiversidad y el desarrollo socioeconómico, teniendo en cuenta aspectos sociales y culturales, es uno de los enfoques planteados en el ámbito del Convenio de Diversidad Biológica de las Naciones Unidas (35). Así, una estrategia es el uso sostenible de algunos de los elementos de la biodiversidad y el establecimiento de sistemas de manejo agroforestal de plantas nativas, que promuevan la conservación del bosque, obteniendo servicios ambientales y desarrollo económico, cultural y social (36,37).

A partir de los resultados de los ODM, en el 2015 Colombia junto a 192 países asumió la agenda para conseguir los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) que se articulan a los Planes Nacionales de Desarrollo PND, la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) y el acuerdo del país contra el cambio climático. Así, fue priorizada la transformación hacia sociedades sostenibles y resilientes. El estudio y conservación de los ecosistemas responden directa o indirectamente a los ODS: “Vida de Ecosistemas Terrestres”, “Vida Submarina”, “Acción por el Clima”, “Agua Limpia y Saneamiento”, “Producción y Consumo Responsables” y “Salud y Bienestar” (38).

Asimismo, según las políticas de bosques del CONPES 2834 de 1996, los bosques secos son un recurso estratégico para la diversidad biológica, étnica y ambiental, por lo cual se debe promover la protección y aprovechamiento sostenible, en donde la investigación es un instrumento de apoyo (39). Dentro de PND 2018-2020 una de las metas es reducir la deforestación en un 30%; además,

declara el pacto por la sostenibilidad: “producir conservando y conservar produciendo”. Asimismo, es una de las políticas del Pacto Región Caribe el programa para el “Aprovechamiento sostenible, recuperación y mantenimiento de los ecosistemas” (40).

En el país, los grupos de organismos de los cuales se tiene un mejor conocimiento de su taxonomía, son las plantas y aves, pero es necesario incrementar los estudios dirigidos a dilucidar sus relaciones filogenéticas y genética poblacional que permitan tener claridad en temas como la evolución, biogeografía, ecología, y tener herramientas ideales para plantear planes de conservación (5). Las especies del Bs-T pueden estar sufriendo alteraciones en su estructura genética por aislamiento y alteración del flujo génico entre poblaciones, generado por la alta fragmentación que este sufre. debido a esto es necesario la conservación de las especies de este ecosistema (41,42). Dentro de las especies que están siendo conservadas se encuentra *Lecythis minor*, la cual está incluida dentro de la estrategia nacional de conservación de plantas para el Caribe colombiano (5) y en los actuales planes de restauración ejecutados en el Proyecto Titi Cabeciblanco junto a otras especies. Por tanto, para conservar eficientemente se deben identificar la diversidad genética de las poblaciones, y así entender su dinámica y capacidad de adaptación (43), y establecer estrategias de recuperación.

Las plantas pueden responder a cambios abióticos y bióticos, generados por la perturbación y expresados en cambios de atributos químicos, fisiológicos y morfológicos acorde a su capacidad de respuesta ante alteraciones ambientales (44). Por tanto, el origen y la diversidad genética del material forestal reproductivo logra afectar de forma significativa el crecimiento, la supervivencia, la productividad de los árboles y en gran medida su adaptación al medio, por consiguiente, se ve afectada la autosostenibilidad de las diversas poblaciones (45). Debido a esto, es importante tener en cuenta que una adecuada atención a la calidad genética del material forestal reproductivo, debe considerarse de vital importancia para la restauración de los bosques, incluyendo las actividades relacionadas con la plantación de árboles cuyo fin vaya encaminado a rehabilitar los procesos ecológicos autógenos para permitir a las poblaciones reorganizarse por sí mismas y formar comunidades que sean funcionales, resilientes y con mayor adaptación a las condiciones

cambiantes, al tiempo que proporcionan servicios ecosistémicos fundamentales (46). Considerando lo anterior, se debe tener en cuenta que el conocimiento de la diversidad genética de las especies que serán introducidas en los distintos ambientes y la adecuada elección de las fuentes de suministro de semillas tiene consecuencias positivas en el índice de supervivencia a corto, mediano y largo plazo (45).

L. minor además de ser una especie que es utilizada en procesos de reforestación, posee otros valores agregados que son su madera y el aceite rico en selenio que se extrae de sus semillas (10), el cual está empezando a ser aprovechado en Colombia por algunas empresas que ofrecen una alternativa sostenible de ingresos para las comunidades que aprovechan los recursos del bosque (47). Por todo esto se hace necesario conocer el componente genético y la selección de las distintas poblaciones de *L. minor* en el Caribe colombiano que tienen distribuciones restringidas y son de interés económico.

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Evaluar marcadores moleculares para el estudio poblacional de *Lecythis minor*.

2.2 Objetivos específicos

- Probar marcadores ISSR en *Lecythis minor*
- Evaluar la transferibilidad de marcadores microsatélites de especies de Lecythidaceae en *Lecythis minor*.
- Estimar la diversidad genética de los marcadores evaluados en *Lecythis minor*.

3. Marco Teórico

Bosque seco tropical

El Bosque seco Tropical (Bs-T) en Colombia presenta climas cálidos áridos, cálidos semiáridos y cálidos secos, con precipitación inferior a los 2000 mm, que fluctúa entre 789 mm (Isla de Tierra Bomba-Bolívar) y los 1800 mm (pie de monte de la cordillera central-Valle del Cauca), teniendo una precipitación total de entre 700 mm y 2000 mm y se presentan tres o más meses secos en el año (48), siendo el estrés hídrico una de las principales características que presentan por una pronunciada época seca con poca o ninguna precipitación (49). Las áreas de Bs-T de mayor extensión y mejor conservadas se ubican en la región Caribe colombiana, en el departamento del Magdalena, en el Parque Nacional Natural Tayrona, con una extensión de 7300 ha aproximadamente y le sigue el Parque-Reserva Mamancana con aproximadamente 600 ha. En el departamento de Bolívar, en el municipio de Zambrano hay cerca de 99.000 ha. En las zonas altas de los Montes de María se encuentran aproximadamente 3000 ha. Con una menor cobertura encontramos el Santuario de Fauna y Flora los Colorados, con 1000 ha, la isla de Tierra Bomba, cercana a la ciudad de Cartagena, con 570 ha, los bosques de Arroyo Grande con 700 ha, la Reserva Forestal Protectora de Caño Alonso con 450 ha, cerca de Valledupar está el Eco-parque Los Besotes con aproximadamente 400 ha y varios predios privados con vocación conservacionista (50).

Debido a las condiciones climáticas presentadas en el Bs-T, este presenta zonas no inundables e inundables, encontrando en la zona no inundable o ribera del cuerpo de agua especies de plantas con flores. Y para la zona inundable o que tiene influencia directa del agua acumulada, se

observa un cambio en la composición de especies vegetales predominando aquellas que poseen adaptaciones para soportar exposición a niveles de agua (superficial y subterránea) durante largo tiempo, dentro de las especies que podemos encontrar tanto en esta área como en zonas no inundables se encuentra *Lecythis minor* (51).

En su mayoría el bosque seco tropical colombiano presenta un mosaico de diferentes estados de sucesión originados principalmente por acción antrópica, que en su mayoría se encuentran en estados de sucesión temprana (52). Los diferentes remanentes de bosque en su mayoría se encuentran aislados geográficamente los unos de los otros originando un gran porcentaje de endemismo dentro de este ecosistema para diferentes grupos biológicos; en particular para el caso de plantas leñosas en el Caribe colombiano hay cerca de un 73% de endemismo distribuido en 41 géneros (53).

Lecythidaceae

Lecythidaceae es una familia pantropical, subdivida en cinco subfamilias, con una gran variación morfológica la cual podemos encontrar desde árboles de porte pequeño hasta árboles muy grandes, los cuales poseen las siguientes características generales: hojas alternas, simples con márgenes normalmente enteros, estípulas ausentes o diminutas; inflorescencias terminales, axilares o caulinas; flores actinomorfas o cigomorfas, hermafroditas, de 2 a 6 sépalos, usualmente de 3 a 6 sépalos, algunas veces 8 y muy raramente de 12 a 18, imbricados, libres; Con un gran número de estambres; anteras biloculares, introrsas; con los ovarios en posición inferior, semiinferior, generalmente de 2 a lóculos; estilo corto y raramente largo; frutos que van desde indehiscentes, carnosos, leñosos hasta dehiscentes, los cuales pueden llegar a ser de gran tamaño; semillas aladas o sin alas, en muchos géneros el endospermo es muy ausente o escaso, arilos presentes y ausente; esta familia es propia de tierras bajas y húmedas (54), teniendo un reporte en Colombia de 77 especies distribuidas en 9 géneros (55).

Lecythis minor

Se encuentra distribuida en el norte de Suramérica en Venezuela y Colombia. Esta presenta una distribución en Colombia en departamentos como: Atlántico, Córdoba, Santander, Magdalena, Valle y Bolívar. *L. minor* se caracteriza por tener una altura y diámetro de hasta 25 metros y 53 centímetros respectivamente; con hojas simples alternas, ovoides rígidas con un tamaño de 8,5 a 24 cm de largo y 4,5 a 10 cm de ancho. Florece entre los meses de abril a diciembre y su inflorescencia mide 20 cm, con flores de 0,5 cm de largo que presentan un pedúnculo corto, las cuales son polinizadas por abejas; su fruto es leñoso en forma de urna u olla y sus semillas son de forma oblonga las cuales son dispersadas por monos y murciélago(9).

Diversidad genética

La diversidad genética hace referencia a las variaciones heredables ocurridas en cada uno de los organismos, entre organismos de una población y entre poblaciones de una misma especie. Esta es la que les confiere a las distintas especies la capacidad de responder a cambios medioambientales, incluidos las presiones originadas por los seres humanos. Convirtiéndose en la base de los procesos evolutivos (56).

Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares se definen como regiones o segmentos de ADN los cuales están distribuidos a lo largo del genoma y que representan las diferencias a nivel de genoma (57). Es posible hacer una correlación entre los marcadores moleculares y la expresión de un rasgo de interés, lo cual se ha vuelto un objetivo clave dentro de la genética; a medida que se han

desarrollado los distintos marcadores moleculares se ha ido ampliando la utilidad de estos que van desde el mapeo de genes, la genética de poblaciones, las reconstrucciones filogenéticas, las pruebas de filiación y la medicina forense (58).

Existen unos criterios para que un marcador molecular sea ideal y son los siguientes: que sea altamente polimórfico y este distribuido a lo largo del genoma, que proporcione una interpretación adecuada de las diferencias genotípicas, que sea de fácil ejecución, rápido y económico, que necesite poca cantidad de tejido y ADN, que esté relacionado con distintos fenotipos y que no requiera de información a priori sobre el genoma del organismo de estudio (59).

Según la técnica empleada para detectar los marcadores moleculares estos pueden clasificarse en tres categorías: técnicas no basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), las cuales se basan en hibridación, es decir, en polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción; técnicas basadas en PCR entre las que se encuentran los RAPD (amplificación aleatoria de ADN polimórfico), los microsatélites, entre otros; y por último y más reciente las técnicas basadas en secuencias en la que se encuentra los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) (59).

Marcadores microsatélites (SSR)

Los marcadores microsatélites son secuencias cortas repetidas en tándem de 2 a 6 nucleótidos y que se encuentran dispersos de forma aleatoria en el genoma. Estos son altamente polimórficos, presentan herencia mendeliana simple y son codominantes (60). El alto grado de polimorfismo exhibido por los microsatélites está sustentado en su alta tasa de mutación, entre 10^{-2} y 10^{-5} por generación (61).

La detección de los microsatélites está basada en la PCR, en la que se amplifican las regiones donde están contenidos utilizando cebadores específicos. Estos son fáciles de medir y analizar; las

los análisis y no siendo necesaria información preliminar de las secuencias para diseñar los *primers* (63,68).

Diversidad genética en Lecythidaceae

El estudio de la familia Lecythidaceae se ha centrado principalmente en el aspecto químico, evaluando los distintos componentes extraídos de sus diferentes miembros, siendo pocos los trabajos enfocados al estudio de la diversidad genética de las especies pertenecientes a esta familia. Los primeros estudios fueron publicados en el año 1988, donde analizaron la variabilidad genética dentro y entre dos poblaciones de *Bertholletia excelsa* utilizando isoenzimas como marcadores, encontrando una alta variación genética (69,70).

La aparición de los marcadores microsatélites como herramientas para el estudio de la diversidad ha jugado un papel muy importante. Y su uso dentro de la familia empezó en el año 2009 mediante el desarrollo y caracterización de 12 marcadores microsatélites polimórficos para la castaña de Brasil *Bertholletia excelsa*, donde se identificaron de 6 a 18 alelos por marcador (71).

Para el año 2009 fueron desarrollados 15 marcadores microsatélites para *Cariniana estrellensis* y se probó la transferibilidad de estos en *Cariniana legalis*. De todos los marcadores probados 12 fueron transferidos a efectivamente a *C. legalis*, donde se encontró un promedio de alelos de 9 demostrando la transferibilidad de marcadores entre especies del mismo género de las Lecythidaceas (72).

En el año 2010 se caracterizaron 12 marcadores microsatélites para *C. legalis* que habían sido desarrollados previamente para *C. estrellensis*. De todos los marcadores probados 10 fueron polimórficos, donde se encontraron para cada uno entre 2 y 11 alelos (73).

Posteriormente en el año 2013 en sentido contrario, se desarrollaron un total de 13 marcadores microsatélites para *C. legalis* y se probó su transferibilidad en *C. estrellensis*; 11 marcadores fueron polimórficos encontrando de 2 a 15 alelos en *C. legalis* y de 3 a 12 en *C. estrellensis* (74).

C. legalis y *C. estrellensis* están consideradas en peligro de extinción por lo que se aumentaron los esfuerzos para su conservación, desarrollando los SSR mencionados anteriormente. En el año 2015 se utilizaron estos marcadores para investigar la estructura genética espacial y el flujo de polen en tres poblaciones pequeñas aisladas de *C. legalis*, generando resultados que pueden ser utilizados en programas de reforestación; como es la distancia necesaria para recolectar semillas de árboles que no estén emparentados, la distancia para recolectar semillas de árboles que no se apareen entre sí. Sugiriendo que la distancia de recolección de semillas para reproducción, conservación y restauración sea de 350 metros y que además se incluya la recolección de semillas de poblaciones que no fueron incluidas en el estudio (75).

En el año 2013 se desarrollaron 7 marcadores microsatélites para *Bertholletia excelsa*, encontrando de 3 a 7 alelos por marcador (76). Para el año 2015 se analizó la estructura genética de la especie a diferentes escalas espaciales, con el fin de generar conocimiento útil para planes de conservación; encontrando una diversidad genética moderada y presentando diferentes niveles de estructuración genética en sus poblaciones, diferenciándose solo una de las poblaciones con relación a las otras (77).

En los estudios realizados dentro de la familia también se ha implementado el uso de marcadores microsatélites en regiones de transcripción. En el 2015 se desarrollaron este tipo de marcadores para evaluar la diversidad genética de *Barringtonia racemosa*, donde probaron 30 marcadores de los cuales 15 amplificaron; estos también amplificaron para *B. asiática* y *B. acutángula* probando la transferibilidad de estos para distintas especies del género (78).

Bertholletia excelsa es una de las especies insignias de la familia y como ya se ha mencionado, hay varios estudios que evaluaron la diversidad genética de manera exitosa, debido a la importancia económica de la especie los esfuerzos para investigarla son altos por lo que en el año 2017 se evaluó la diversidad y estructura genética de la especie utilizando marcadores desarrollados previamente, encontrando una diversidad moderada y una estructuración de tres grupos que se superponen entre sí, teniendo un flujo efectivo de genes (18).

Debido a la fragmentación del bosque seco, se ha hecho necesario el estudio del efecto de la fragmentación sobre la estructura genética de las poblaciones naturales por lo que en el 2016 se desarrollaron 13 loci microsatélites para *Foetidia mauritiana* y probaron su transferibilidad en *Foetidia rodriguesiana*, de los cuales 12 marcadores amplificaron para esta especie (79). Posteriormente se evaluó la diversidad y el flujo genético de *Foetidia mauritiana* y *Foetidia rodriguesiana* en el bosque seco tropical fragmentado de las islas Mascareñas, encontrando una diversidad genética alta, un alto nivel de autofecundación y flujo genético restringido entre las distintas poblaciones (80).

Diversidad genética en *Lecythis*

En el género *Lecythis* son escasos los estudios de diversidad genética, para este solo se encuentran el desarrollo de marcadores microsatélites para *Lecythis ampla* y *Lecythis pinosis* (19,20). En el caso *Lecythis minor* hasta la fecha no hay estudios de la diversidad genética de ninguna de sus poblaciones.

4. Diseño Metodológico

4.1 Tipo de Estudio

Estudio descriptivo de corte transversal.

4.2 Área de Estudio

Se realizaron muestreos en la Región Caribe, en los departamentos de Atlántico, Bolívar, Cesar, Magdalena y Sucre (Figura 2).

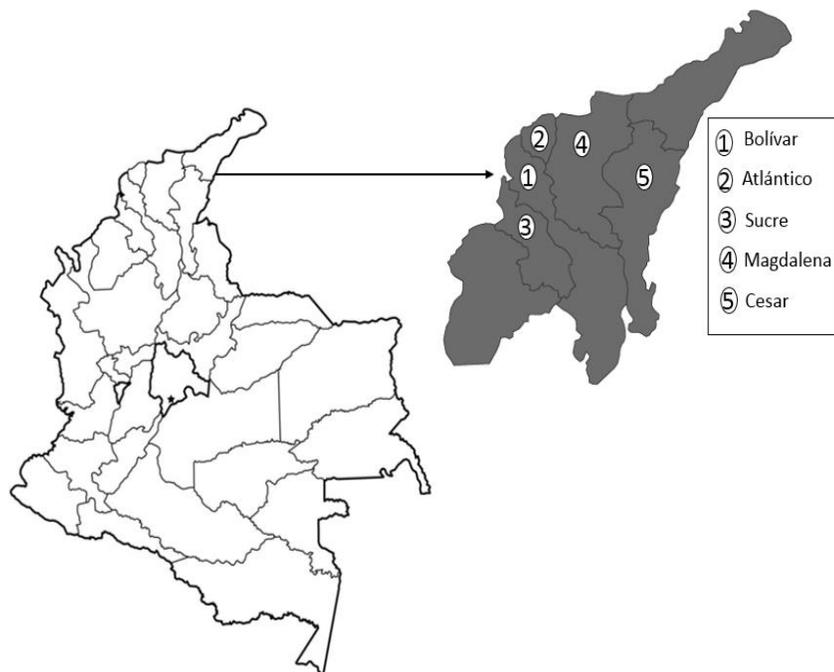


Figura 2. Áreas de muestreo.

4.3 Toma de muestras

Se colectaron entre 5 y 10 individuos de las poblaciones de *Lecythis minor* ubicadas en diferentes municipios de los cinco departamentos (Tabla 1), con una distancia no menor a 50 metros entre cada árbol. En cada caso se tomaron hojas frescas que se conservaron en tubos de ensayo con sílica gel y se transportaron a la unidad de investigación en microbiología para su posterior procesamiento.

Tabla 1. Lugares muestreados por departamento

Departamento	Lugar de muestreo	Coordenadas
Atlántico	Los Limites	10°38'51"N 75°13'41"W
	Palmar de Candelaria	10°39'59"N 75°09'15"W
	Piojó	10°44'49"N 75°05'21"W
	San Juan de Tocagua	10°38'33"N 75°10'20"W
	Molinero	10°40'18"N 75°02'58"W
	Baranoa	10°48'12"N 74°55'02"W
	Megua	10°51'21"N 74°54'01"W
Bolívar	Colorado Viejo	10°39'42"N 75°16'11"W
	Garcero	9°02'05"N 74°07'18"W
	Chapetona	8°55'13"N 73°57'56"W
	Playitas	8°50'23"N 73°58'11"W
Magdalena	Pinto	9°27'57"N 74°43'03"W
	Santa Ana	9°24'52"N 74°38'37"W
Sucre	Ovejas	9°34'18"N 75°11'37"W
Cesar	Becerril	9°42'42"N 73°16'59"W

4.4 Fase de laboratorio

4.4.1 Extracción de ADN

Se siguió la metodología propuesta por Doyle and Doyle CTAB (81).

Para ello se pesó 5 mg de tejido vegetal, se agregó 1 ml de buffer de lisis (Tris-HCl 100 mM, EDTA 20 mM, NaCl 1,4 M, CTAB 2%), se maceró, se transfirió a un tubo de microcentrífuga se agregó 2 μ L de β -mercaptoetanol y se mezcló por inversión. Se incubó a 65°C por 45 minutos, cada 15 minutos se mezcló moderadamente por inversión. Se agregó un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1. Luego se recuperó 800 μ L de la fase acuosa y se agregó nuevamente un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1. Se extrajo 500 μ L de la fase acuosa y se precipitó el ADN con 2/3 volúmenes de isopropanol. Se descartó sobrenadante y se lavó 2 veces con 1 mL de etanol frío al 70%, se secó boca abajo hasta que no quedara presencia de etanol en el tubo. Finalmente se hidrató con 50 μ L de agua destilada estéril.

4.4.2 Transferibilidad de marcadores ISSR a *L. minor*

Se realizó una búsqueda en la literatura de marcadores moleculares para *L. minor* y no se encontró marcadores ISSR desarrollados para la especie, por lo que se procedió a seleccionar marcadores desarrollados en *Berthotellia excelsa* (82) (Tabla 2).

Para probar los ISSR se seleccionaron 8 individuos provenientes de Ovejas, Colorado Viejo, Garcero, Santa Ana barro blanco, Santa Bárbara de Pinto, San Juan de Tocagua, Palmar de Candelaria y Becerril (Figura 3) que cubren la distribución de las poblaciones en la región Caribe.

Las amplificaciones fueron realizadas en un volumen total de 15 μ L que contenían de 1x polimerasa Onetaq máster mix 1X (NEW ENGLAND BioLabs), 0,2 μ M primer forward, 0,2 μ M primer reverse y 50ng ADN. Las amplificaciones se hicieron con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 94°C por 30 segundos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, de

47°C y 50°C (según el *primer*) por 45 segundos, 68°C por 1 minuto 30 segundos y una extensión final de 5 minutos.

Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 2%, con un voltaje constante de 70V durante 140 minutos, de referencia se utilizó escalera de peso molecular 1Kb DNA Ladder (New England Biolabs), la coloración fue hecha con SYBR SAFE (Invitrogen). La visualización de los productos de amplificación se hizo en un transiluminador.



Figura 3. Ubicación geográfica de los individuos evaluados. Tomada y modificada de Google Earth. Los individuos y su ubicación están señalados con los iconos azules.

Tabla 2. Marcadores ISSR probados en *L. minor* (82)

Locus	Secuencia de primer (5'-3')
Di(AG)8T	AGAGAGAGAGAGAGAGT
Di(AG)8C	AGAGAGAGAGAGAGAGC
Di(CA)8G	CACACACACACACACAG
Di(AC)8G	ACACACACACACACACG
Di(GA)8YT	GAGAGAGAGAGAGAGAYT
Di(GA)8YG	GAGAGAGAGAGAGAGAYG
Di(CT)8RC	CTCTCTCTCTCTCTRC

4.4.3 Transferibilidad de marcadores microsatélites de otras especies a *L. minor*

Igualmente se realizó una búsqueda en la literatura de marcadores microsatélites desarrollados para *L. minor* y hasta ahora no existen marcadores específicos para la especie, ni estudios de diversidad genética de ninguna de las poblaciones de la especie, por lo que se procedió a seleccionar marcadores desarrollados en *Berthotellia excelsa* y *Lecythis pinosis* (19,71,76) (Tabla 3).

Para probar la transferibilidad se seleccionaron 8 individuos provenientes de Ovejas, Colorado Viejo, Garcero, Santa Ana barro blanco, Santa Bárbara de Pinto, San Juan de Tocagua, Palmar de Candelaria y Becerril (Figura 3) que cubren la distribución de las poblaciones en la región Caribe.

Las amplificaciones fueron realizadas en un volumen total de 15 µL que contenían de 1x polimerasa Onetaq máster mix 1X (NEW ENGLAND BioLabs), 0,2 µM primer y 50ng ADN. Las amplificaciones se hicieron empleando el siguiente perfil térmico: desnaturalización inicial de 94°C

por 30 segundos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, de 51°C a 55°C (según el primer) por 30 segundos, 68°C por 1 minuto y una extensión final de 5 minutos.

Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 2,5%, con un voltaje constante de 60V durante 100 minutos, como referencia se utilizó escalera de peso molecular 100pb DNA Ladder (New England Biolabs), la coloración fue hecha con SYBR SAFE (Invitrogen). La visualización de los productos de amplificación se hizo en un transiluminador.

Tabla 3. Marcadores microsatélites probados en *Lecythis minor*.

Locus	Código de acceso Genbank	Secuencia de primer (5'-3')
Bet14 ⁽⁷⁶⁾	JX964796	F: GTGTACTTCTCTGGTTGGGGC R: CCCGAGTTCATTACCCAAACT
Bex09 ⁽⁷¹⁾	EU789628	F: TATCCATGGTCCTCCGT R: AGTCAATCATCTTCAAGAGT
Bex22 ⁽⁷¹⁾	EU789630	F: GCATTCTCTATTTTCGCTTG R: CCCTAGCAATCGTCGTCTTC
Bex33 ⁽⁷¹⁾	EU789634	F: CAAGTCTCTGACTCATCGCCTA R: ACCAGGTTGAGCAGACGTTT
Lec144 ⁽¹⁹⁾	KM092089	F: AgggTgCCCAACCTCTTTTg R: AggAgTAgCCTTgTgTTgAC
Lec172 ⁽¹⁹⁾	KM092091	F: TTAGCTgACTggAAggTggC R: CgAACAgTgTCTTCCTTTCgg
Lec195 ⁽¹⁹⁾	KM092092	F: ggAgTgCgTgAgAAATAggg R: gCTTCTCCAAACCCACgAAg
Lec263 ⁽¹⁹⁾	KM092095	F: gCATgCTTTTgTgCACgC R: ACCACACATACCTgTTgTTgAAg
Lec280 ⁽¹⁹⁾	M092098	F: AgCTTCTTAAAAATCaggTTgCC R: CTCgTgAgCATCTCTCCCTC
Lec287 ⁽¹⁹⁾	KM092099	F: TgAgCTCCgTTAgCTT R: ACgAgTCATCCTCAAaggCTC

4.5 Análisis de Datos

Para los ISSR se construyeron matrices binarias de presencia/ausencia para cada banda polimórfica. Se cuantificó el número de bandas totales y bandas polimórficas y mediante el programa GenAlex 6.5 (83,84) se calculó: número de alelos efectivos (N_e), Índice de Shannon (I), diversidad genética (h) y el contenido de información polimórfica se calculó mediante la siguiente formula (85)

$$PIC_i = 2f_i(1 - f_i)$$

Donde f_i es la frecuencia de las bandas presentes o fragmentos amplificados y $(1 - f_i)$ es la frecuencia de las bandas ausentes o fragmentos no amplificados.

Para el caso de los SSR la determinación del tamaño de los alelos se hizo utilizando el r_f de cada una de las bandas y se construyó la matriz tomando una columna por cada locus y registrando los distintos tamaños de los alelos para cada locus. Se calculó el número de alelos por locus (N_a), número de alelos efectivos (N_e), índice de Shannon (I), heterocigosidad observada (H_o), heterocigosidad esperada insesgada (uH_e), y el Índice f (F) mediante el programa GenAlex 6.5 (83,84) y el índice de contenido polimórfico (PIC) se calculó mediante el programa CERVUS (86).

Los cálculos realizados se confirmaron mediante el programa Popgene (87) y Genepop (88,89).

5. Resultados

De los 7 marcadores ISSR probados, cinco amplificaron y generaron bandas claras cuantificables. Asimismo, se transfirieron 7 de 10 marcadores SSR en *Lecythis minor* desarrollados para *Bertholletia excelsa* (71,76) y *Lecythis pinosis* (19) (Tabla 4).

Tabla 4. Lista de marcadores transferidos y no transferidos.

Locus	Tm °C	Número de alelos (bandas)
Bet14	53	2
Bex09	53	3
Bex22	53	5
Bex33	53	5
Lec144	55	3
Lec172	51	2
Lec195	53	0
Lec263	53	0
Lec280	53	0
Lec287	53	5
Di(AG)8T	47	3
Di(AG)8C	47	6
Di(CA)8G	50	0
Di(AC)8G	50	11
Di(GA)8YT	47	0
Di(GA)8YG	47	3
Di(CT)8RC	47	8

5.1 ISSR

Los cinco *primers* ISSR que produjeron un patrón de bandas (Figura 4) de ADN generaron un total 31 fragmentos, de los cuales el 80,6% (25 bandas) resultaron polimórficas. El número de bandas amplificadas por cebador osciló entre 3 y 11 con un promedio de 6,2 bandas. Todos los

marcadores ISSR presentaron un alto porcentaje de bandas polimórficas que varió de 66,6% a 100%. El número de alelos efectivos osciló 1,5 y 1,91, con un promedio de 1,77. El promedio de la diversidad genética de Nei fue de 0,425 y el promedio del índice de información de Shannon fue de 0,526. El contenido de información polimórfica osciló entre 0,218 y 0,416, con un promedio de 0,3398. Los marcadores ISSR Di(CT)8RC y Di(AC)8G, obtuvieron los valores más altos con 0,416 y 0,351 respectivamente (Tabla 5).

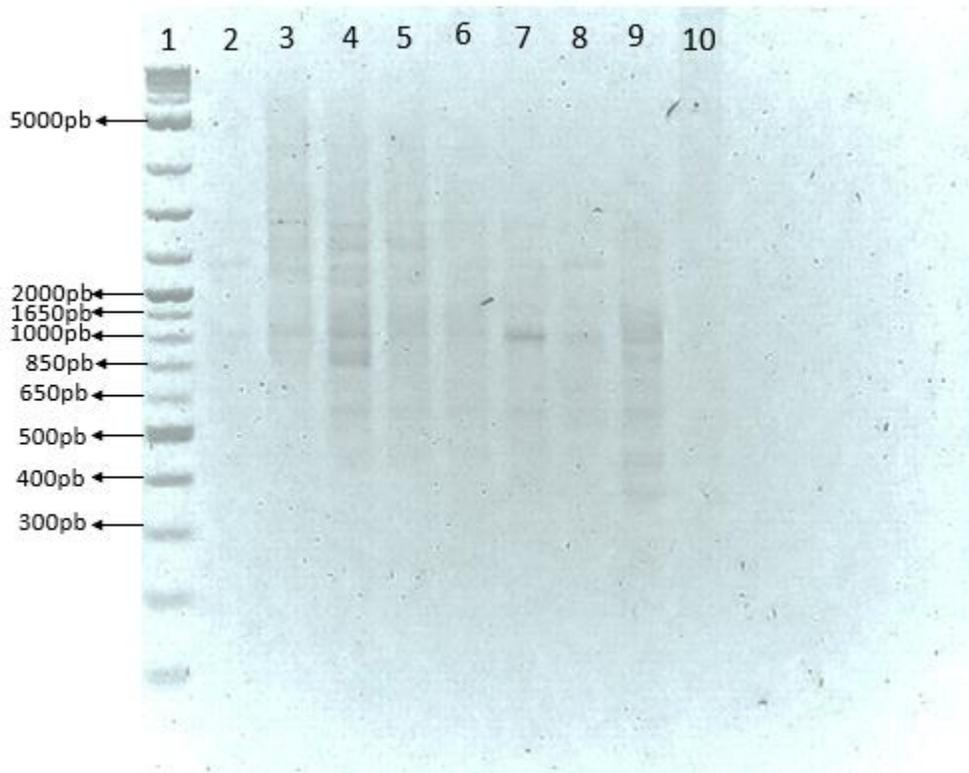


Figura 4. Patrón electroforético generado por ISSR Di(AG)8C en 8 individuos de *L. minor*. **1)** Escalera de peso molecular 1 kb; **2)** Lo4; **3)** Lc8; **4)** LG45; **5)** LBb32 **6)** Lsp40; **7)** Ls23; **8)** Lp26; **9)** LBe68; **10)** Control negativo.

Tabla 5. Características de los marcadores ISSR transferidos en *Lecythis minor*

Primer ISSR	Bandas		Ne	uHe	I	h	PIC
	totales	Bandas polimórficas					
Di(AG)8T	3	3	1,91	0,509	0,67	0,477	0,354
Di(AG)8C	6	4	1,84	0,487	0,649	0,457	0,218
Di(AC)8G	11	9	1,5	0,322	0,466	0,302	0,371
Di(GA)8YG	3	3	1,89	0,502	0,664	0,471	0,27
Di(CT)8RC	8	6	1,74	0,445	0,606	0,418	0,416
Total	31	25					
Promedio	6,2	5	1,776	0,453	0,596	0,425	0,3398

Bandas totales, bandas polimórficas, número de alelos efectivos por locus (Ne), Índice de Shannon (I), Diversidad Genética de Nei (h) y Índice de Contenido Polimórfico (PIC)

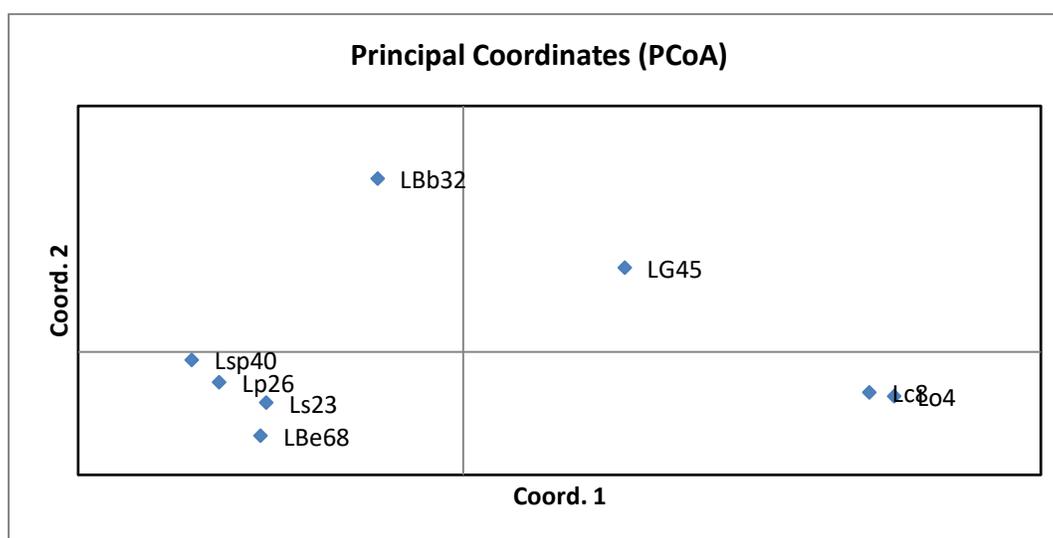


Figura 5. Análisis de coordenadas principales (PCoA) generado a partir de ISSR: Lo4 (Ovejas), Lc8 (Colorado Viejo), LG45 (Garcero), Lb32 (Santa Ana Barro Blanco), Lsp40 (Santa Bárbara de Pinto), Ls23 (San Juan de Tocagua), Lp26 (Palmar de Candelaria) y LBe68 (Becerril).

Según el análisis de coordenadas principales realizado a partir de marcadores ISSR, la distribución de la mayoría de los especímenes utilizados es congruente con la distribución (Figura 3), se agrupan los individuos geográficamente cercanos como los de Santa Bárbara de Pinto, Palmar de Candelaria, Garcero, y San Juan de Tocagua; sin embargo, el individuo de Becerril se agrupa junto

a estos a pesar de estar distanciados. Además, se agrupan las muestras de Colorado Viejo y Ovejas, y Santa Ana Barro Blanco, queda aislada del resto.

5.2 SSR

Los siete loci microsatélites transferidos con éxito registraron un número de alelos que osciló de 2 a 5, mientras que el número de alelos efectivos varió de 1,28 a 2,909. La heterocigosidad esperada tuvo un rango de 0,233 a 0,75 siendo el marcador Bex22 el que obtuvo el mayor valor para este parámetro evaluado. El índice de Shannon presentó valores que van de 0,377 a 1,296, siendo el marcador Bet14 que arrojó el valor más bajo. Los valores PIC más altos fueron de locus Bex22 con 0,617 y Lec287 con 0,595; los valores PIC fueron similares entre los loci SSR, a excepción de los locus Bet14 y Lec172 que presentaron valores de 0,195 y 0,239 respectivamente (Tabla 6), presentando los valores de polimorfismo más bajos, siendo los locus menos informativos.

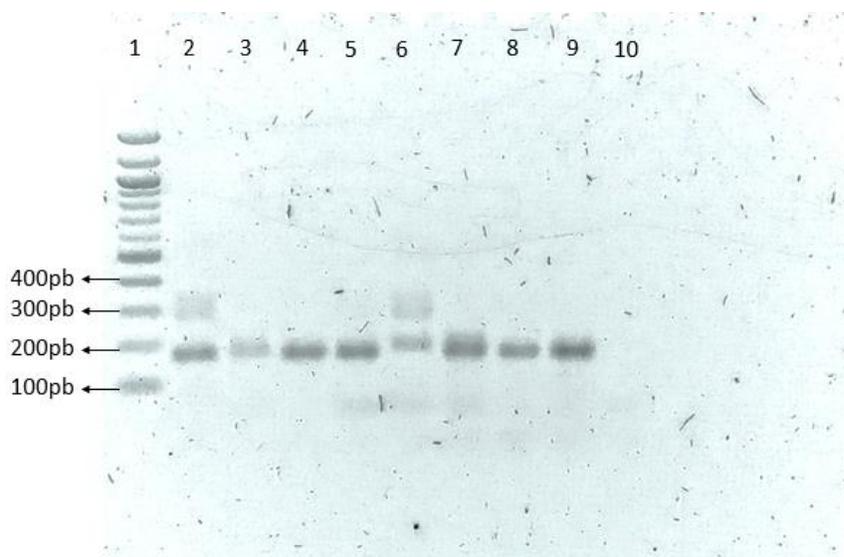


Figura 6. Patrón electroforético generado por SSR Bex33 en 8 individuos de *L. minor*. **1)** Escalera de peso molecular 100 pb; **2)** Lo4; **3)** Lc8; **4)** LG45; **5)** LBb32 **6)** Lsp40; **7)** Ls23; **8)** Lp26; **9)** LBe68; **10)** Control negativo.

Tabla 6. Características de los marcadores SSR transferidos en *Lecythis minor*

Locus	Na	Ne	I	Ho	He	uHe	F	Pic
Lec144	3	2,571	1,011	0,000	0,611	0,667	1,000	0,535
Lec172	2	1,385	0,451	0,000	0,278	0,303	1,000	0,239
Bex33	5	2,327	1,160	0,250	0,570	0,608	0,562	0,539
Lec287	5	2,909	1,249	0,875	0,656	0,700	-0,333	0,595
Bex09	3	1,815	0,796	0,000	0,449	0,484	1,000	0,406
Bex22	5	3,063	1,296	1,000	0,673	0,725	-0,485	0,617
Bet14	2	1,280	0,377	0,000	0,219	0,233	1,000	0,195
Total	25	-	-	-	-	-	-	-
Media	4	2,193	0,906	0,304	0,494	0,531	0,535	0,447

Número de alelos por locus (Na), número de alelos efectivos (Ne), índice de Shannon (I), heterocigosidad observada (Ho), heterocigosidad esperada insesgada (uHe), Índice F (F), índice de contenido polimórfico (PIC).

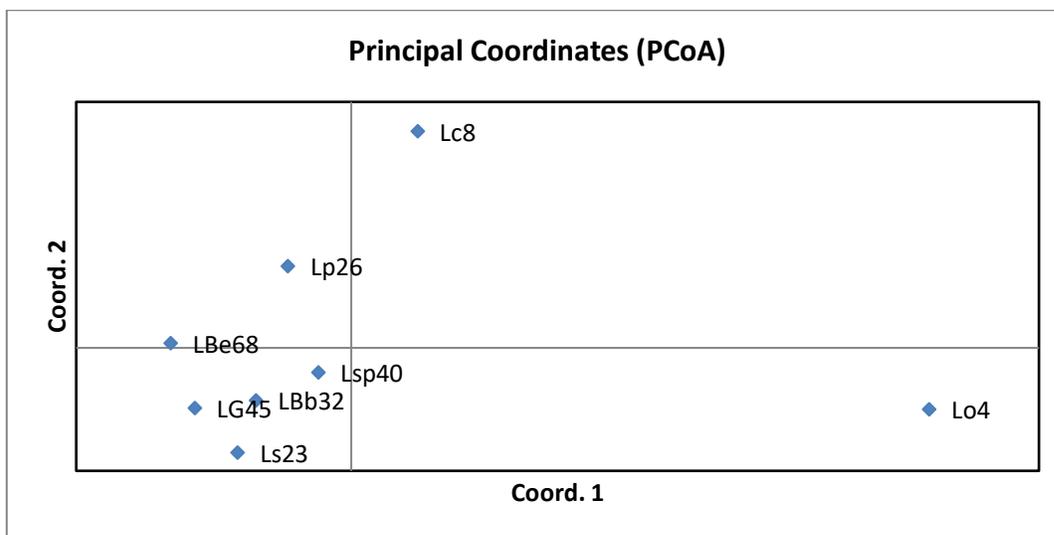


Figura 7. Análisis de coordenadas principales (PCoA) generados a partir de SSR: Lo4 (Ovejas), Lc8 (colorado viejo), LG45 (Garcero), Lb32 (Santa Ana Barro Blanco), Lsp40 (Santa Bárbara de Pinto), Ls23 (San Juan de Tocagua), Lp26 (Palmar de Candelaria) y LBe68 (Becerril).

El análisis de coordenadas realizados a partir de marcadores SSR es congruente en parte con la distribución geográfica de los especímenes utilizados (Figura 3), agrupando a los individuos de Santa Bárbara de Pinto, Garcero y Santa Ana Barro Blanco y San Juan de Tocagua que se encuentra

un poco más alejado de estos. En este análisis también se separan a las muestras de colorado y ovejas que está bastante distanciado.

6. Discusión

A pesar de que hay algunos estudios a nivel genético dentro de la familia Lecythidaceae, este es el primero en evaluar marcadores moleculares para el estudio de la diversidad genética en *Lecythis minor*. Se amplificaron doce marcadores moleculares en la especie de estudio, encontrándose altos niveles de polimorfismo para los dos tipos de marcadores analizados, los cuales tendrán alto poder para discriminar dentro y entre poblaciones de la especie.

Los marcadores moleculares ISSR utilizados en este trabajo presentaron un número de bandas polimórficas (3 a 9) útiles para futuros estudios poblacionales de *L. minor*. Los ISSR se han utilizado de manera eficiente para evaluar la diversidad genética en muchas otras especies de plantas. Como son el caso del estudio hecho en *Dioscorea hispida* donde se evaluó la diversidad genética de las colecciones de germoplasma mediante la utilización de ISSR, donde el 25% de los marcadores revelaron polimorfismo generando un total de 22 bandas polimórficas, permitiendo seleccionar individuos en base a su coeficiente de distancia genética para futuros programas de reproducción (90). En *Salvadora persica* se estudiaron 20 marcadores, encontrando una amplificación de 11,6 bandas en promedio, y las variaciones genéticas encontradas entre los genotipos generaron información para la selección de progenitores que garanticen alta diversidad en los especímenes utilizados en planes de reforestación (91). Otro estudio, evaluó la diversidad y estructura genética de cuatro especies del bosque seco tropical utilizando 12 marcadores ISSR obteniendo un número de bandas por marcador de 4 a 12 y un porcentaje de bandas polimórficas en rango similar para las cuatro especies, generando información útil para la selección de áreas de conservación de las especies estudiadas (92). En *Bertholletia excelsa* se utilizaron marcadores ISSR para evaluar la diversidad genética, amplificando un total 156 bandas para los 15 marcadores utilizados, de los cuales 132 fueron polimórficos (93).

Uno de los aspectos analizados en el presente trabajo fue el Índice de Shannon que denota el grado de diversidad genética de las poblaciones y va de cero a uno, donde 0 indica una diversidad

genética menor (94). En este estudio se obtuvo un valor medio de I para los marcadores ISSR de 0,596, que en base a lo planteado indica que *L. minor* no presenta una diversidad genética alta. Los ejemplares evaluados en este los cuales cubren la distribución natural de la especie en la región dando una aproximación inicial del estado de la especie. Esto se ve respaldado por el valor medio obtenido de heterocigosidad esperada insesgada que fue de 0,453 lo que indica una diversidad genética moderada de los ejemplares seleccionados para el estudio.

El PIC es el parámetro más importante que se evalúa en un marcador molecular, ya que este mide la eficiencia para revelar el polimorfismo entre diferentes individuos (95). Los marcadores ISSR utilizados se consideran informativos, presentando valores de 0,218 a 0,416; teniendo en cuenta que el valor máximo para este tipo de marcadores es de 0,5 (96).

En el presente estudio fueron transferidos con éxito un gran porcentaje de marcadores microsatélites a *L. minor*. La transferencia de marcadores microsatélites se ha documentado de manera exitosa en varias especies vegetales como por ejemplo en razas autóctonas de guayabas en Venezuela, en *Lupinus mutabilis*, y *Arachis hypogaea*, entre otros (97–99). Dentro de la familia Lecythidaceae también se han transferido con éxito marcadores SSR en *Cariniana legalis*, *Cariniana estrellensis*, *Barringtonia asiática* y *B. acutángula* (72,74,78). La transferibilidad ha demostrado ser una muy buena herramienta para el estudio de la diversidad genética de plantas, en las cuales no se cuenta con información acerca de su genoma.

De los tres SSR transferidos de *Lecythis pinosis* a *L. minor*, fue Lec287 el que presentó mayor número de alelos seguido de Lec144 y Lec172 (tabla 7), en otra investigación encontraron que Lec172 presentó un mayor número de alelos, seguido de Lec144 y Lec287 (19). De los SSR transferidos de *Bertholletia excelsa* a *L. minor* en este estudio, Bex22 y Bex33 fueron los que obtuvieron un mayor número de alelos; lo que concuerda otro trabajo (100). Anteriormente se

encontró algo similar siendo Bex33 el SSR con mayor número de alelos registrados en sus estudios (18,71).

El nivel de transferibilidad moderado de *L. pinosis* a *L. minor* sugiere una relación filogenética remota a diferencia del alto nivel de transferencia observado entre *L. minor* y *B. excelsa*. Diversos autores han evidenciado que algunos géneros dentro de la familia Lecythidaceae pueden no ser monofiléticos, entre los que destacan el género *Lecythis* que exhiben una amplia variación en sus estructuras florales (101,102). En un estudio filogenético realizado a partir de datos combinados de secuencias *ndhF* y *trnL-F*, encontraron que *L. minor* forma un clado con *B. excelsa* y otras especies, estando más relacionada a esta que ha *Lecythis pinosis* (103).

El contenido de información polimórfica varió de 0,195 (Bet14) a 0,17 (Bex33) (tabla7). Los valores PIC superiores a 0,5 se consideran altamente informativos, valores que van de 0,25 a 0,5 se consideran moderadamente informativos y los valores por debajo de 0,25 se consideran poco informativos (104). Por lo que Lec144, Bex33, Lec287 y Bex22 son marcadores altamente informativos en *L. minor*, Bex09 se consideran un marcador moderadamente informativo, y Lec172 y Bet14 se consideran marcadores poco informativos los cuales no son óptimos para posteriores estudios en *L. minor*.

Basados en el análisis de los SSR en el presente trabajo hubo un exceso de homocigotos, lo que podría ser el resultado de eventos de endogamia, que puede aumentar la probabilidad de que se pierdan alelos para las siguientes generaciones, ocasionando la pérdida progresiva de diversidad genética (105). Esto puede estar ocurriendo gracias a la alta fragmentación que ha sufrido el bosque seco tropical en Colombia y en especial en la región Caribe colombiana (33).

El análisis de coordenadas principales de ISSR y SSR arrojó ciertas similitudes y diferencias en cuanto a la manera como se agrupan los individuos de acuerdo con los alelos presentados, lo que es común para ambos análisis es que separa a los individuos de Ovejas y Colorado Viejo. En el caso del individuo de Ovejas, el cual está bastante alejado de los demás especímenes utilizados en el trabajo (Figura 3), este presentó alelos exclusivos para cinco de los siete SSR transferidos en la especie (Figura 6), la distancia geográfica como barrera podría prevenir el intercambio de genes entre poblaciones y causar diferencias genéticas entre los individuos de los distintos lugares (106,107). El espécimen de Colorado Viejo, no amplificó para cuatro de los siete SSR utilizados, este se encuentra aproximadamente a 10 km de los siguientes individuos seleccionados en el estudio (Figura 3); esta falta de amplificación puede deberse a la variación de las regiones flanqueantes de los microsátélites en comparación a los otros individuos; esto puede estar mediado por la distancia geográfica, sumado a la alta fragmentación observada en la zona que interrumpe el flujo génico entre las especies de los distintos fragmentos (33).

Un aspecto importante a tener en cuenta para comprender la diversidad genética moderada exhibida por *L. minor* en el presente trabajo, es el hecho de que su polinización es mediada por insectos y no por el viento (108). Esto sustentado en el hecho que en especies en las que el polen es dispersado por insectos, el grado de conectividad genética de las poblaciones depende de la abundancia, distribución y comportamiento de sus vectores de polinización, los cuales a su vez también se ven afectados por la fragmentación (109). Por lo que de esta manera el flujo genético de las distintas poblaciones de *L. minor* estaría siendo interrumpido, hecho que pudiera estar sucediendo en otras especies dentro del bosque seco.

7. Conclusiones y Recomendaciones

7.1 Conclusiones

Se obtuvo un set de marcadores amplificados en *Lecythis minor*, siendo estos los primeros reportados en la especie, proporcionando una herramienta para el estudio de esta especie a nivel genético poblacional, lo cual podrá tener mucha utilidad para la conservación efectiva de la especie.

Para los marcadores ISSR, cinco primeros generaron bandas claras y cuantificables, resultando ser polimórficos, ofreciendo una excelente herramienta para futuros estudios.

De los 7 marcadores microsatélites amplificados en la especie cinco resultaron ser polimórficos, lo cual brinda un instrumento valioso para futuros estudios en *L. minor*.

En este análisis preliminar *L. minor* exhibió una diversidad genética moderada ocasionada principalmente por la fragmentación que presenta el Bs-T.

7.2 Recomendaciones

Realizar el análisis genético poblacional completo de las distintas poblaciones de *Lecythis minor* en el Caribe colombiano utilizando los marcadores probados con éxito en este trabajo.

Ampliar el set de marcadores moleculares disponibles para la realización de los estudios genéticos poblacionales *L. minor*, sobre todo para los marcadores ISSR.

Evaluar el efecto de la fragmentación sobre el flujo genético entre las distintas poblaciones de *L. minor*.

Referencias Bibliográficas

1. Pennington, R; Lewis, G; y Ratter J. Neotropical Savannas and Seasonally Dry Forests: Plant Diversity ... - Google Libros [Internet]. [cited 2020 Oct 2]. Available from: <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=AD3MBQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Neotropical+Savannas+and+Seasonally+Dry+Forests:+Plant+Diversity,+Biogeography,+and+Conservation&ots=gBfYyuUI5y&sig=5kXTUvtMjdkrotmUW3U6BJcwFns#v=onepage&q=Neotropical+Savannas+and+S>
2. Ballesteros-Correa J, Morelo-García L, Pérez-Torres J. Composición y estructura vegetal de fragmentos de bosque seco tropical en paisajes de ganadería extensiva bajo manejo silvopastoril y convencional en Córdoba, Colombia. *Caldasia*. 2019;41(1):224–34. DOI: 10.15446/caldasia.v41n1.71320
3. Myers N, Mittermeyer RA, Mittermeyer CG, Da Fonseca GAB, Kent J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*. 2000;403:853–8. DOI: 10.1038/35002501
4. Miles L, Newton AC, DeFries RS, Ravilious C, May I, Blyth S, et al. A global overview of the conservation status of tropical dry forests. *J Biogeogr*. 2006;33(3):491–505. DOI: 10.1111/j.1365-2699.2005.01424.x
5. Pizano, C y Garcia H 2014. EL BOSQUE SECO TROPICAL EN COLOMBIA. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. 2014. 354 p. URL: <http://hdl.handle.net/20.500.11761/9333>
6. Redford KH, Taber A, Simonetti JA. There Is More to Biodiversity than the Tropical Rain Forests. *Conserv Biol* [Internet]. 1990 Sep 1 [cited 2020 Oct 2];4(3):328–30. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1523-1739.1990.tb00296.x>
7. Aldana-Domínguez J, Montes C, Martínez M, Medina N, Hahn J, Duque M. Biodiversity and Ecosystem Services Knowledge in the Colombian Caribbean. *Trop Conserv Sci* [Internet]. 2017 Jan 28 [cited 2020 Oct 2];10:194008291771422. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1940082917714229>
8. Armando Dugand. Observaciones taxonómicas sobre las *Lecythis* del Norte de Colombia. *Caldasia*. 1947;4(20):411–26.
9. López R, Martín C, Montero González Bogotá I. Manual de identificación de especies forestales en bosques naturales con manejo certificable para las comunidades. 2005. 128 p.
10. Dernovics M, García-Barrera T, Bierla K, Preud'homme H, Lobinski R. Standardless identification of selenocystathionine and its γ -glutamyl derivatives in monkeypot nuts by 3D liquid chromatography with ICP-MS detection followed by nanoHPLC-Q-TOF-MS/MS. *Analyst* [Internet].

2007 [cited 2020 Oct 2];132(5):439–49. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17471390/>

11. De La Ossa J, De La Ossa Lacayo A. Densidad poblacional de *Saguinus oedipus* (primates callitrichidae) y disponibilidad de alimento vegetal, Colosó, Sucre - Colombia. Rev UDCA Actual Divulg Científica. 2014;17(2):513–20. DOI: 10.31910/rudca.v17.n2.2014.256
12. López, R., Sarmiento, C., Espitia, L., Barrero, A., Consuegra, C., y Gallego-Castillo B. 100 Plantas del Caribe colombiano. 2016. 241 p.
13. Erickson DL, Hamrick JL, Kochert GD. Ecological determinants of genetic diversity in an expanding population of the shrub *Myrica cerifera*. Mol Ecol. 2004;13:1655–64. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2004.02139.x
14. Guichoux E, Lagache L, Wagner S, Chaumeil P, Léger P, Lepais O, et al. Current trends in microsatellite genotyping. Mol Ecol Resour. 2011;11(4):591–611. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2011.03014.x
15. Araya S, Martins AM, Junqueira NT V, Costa AM, Faleiro FG, Ferreira ME. Microsatellite marker development by partial sequencing of the sour passion fruit genome (*Passiflora edulis* Sims). BMC Genomics. 2017;18:549. DOI: 10.1186/s12864-017-3881-5
16. Aranguren-Díaz YC, Varani AM, Michael TP, Miranda VFO. Development of microsatellite markers for the carnivorous plant *Genlisea aurea* (Lentibulariaceae) using genomics data of NGS. Mol Biol Rep. 2018;45(1):57–61. DOI: 10.1007/s11033-017-4140-1
17. Moreira PA, Sousa SA, Oliveira FA, Araújo NH, Fernandes GW, Oliveira DA. Characterization of nine transferred SSR markers in the tropical tree species *Enterolobium contortisiliquum* (Fabaceae). Genet Mol Res. 2012;11(4):3729–34. DOI: 10.4238/2012.August.17.11
18. Cabral JC, Baldoni AB, Tonini H, Azevedo VCR, Giustina LD, Tiago A V., et al. Diversity and genetic structure of the native Brazil nut tree (*Bertholletia excelsa* bonpl.) population. Genet Mol Res. 2017;16(3):1–8. DOI: 10.4238/gmr16039702
19. Rodrigues AB, Florence CT, Mariano-Neto E, Gaiotto FA. First microsatellite markers for *Lecythis pisonis* (Lecythidaceae), an important resource for Brazilian fauna. Conserv Genet Resour. 2015;7:437–9. DOI: 10.1007/s12686-014-0390-6
20. Hernández G, Konrad H, Krumböck S, Geburek T. Novel nuclear microsatellites in the endangered neotropical timber tree *Lecythis ampla* (Lecythidaceae). Silvae Genet. 2014;63:181–4. DOI: 10.1515/sg-2014-0023

21. Rangel-Acosta JL, Martínez-Hernández NJ. Comparación de los ensamblajes de escarabajos copronecrófagos (Scarabaeidae: Scarabaeinae) entre fragmentos de bosque seco tropical y la matriz adyacente en el departamento del Atlántico-Colombia. *Rev Mex Biodivers*. 2017;88:389–401. DOI: 10.1016/j.rmb.2017.03.012
22. Institute CB. Biodiversity Hotspots Revisited, Conservation International, 2011 [Internet]. 2011 [cited 2020 Oct 5]. Available from: <https://databasin.org/datasets/23fb5da1586141109fa6f8d45de0a260>
23. Maass JM, Balvanera P, Castillo A, Daily GC, Mooney HA, Ehrlich P, et al. Ecosystem services of tropical dry forests: Insights from long-term ecological and social research on the Pacific Coast of Mexico. *Ecol Soc*. 2005;10(1):1–23. DOI: 10.5751/ES-01219-100117
24. Pizano C, González R, González M, Castro F, López R, Rodríguez N, et al. Las plantas de los Bosques Secos Tropicales de Colombia. *El Bosque Seco Tropical en Colombia*. 2014. 49–93 p.
25. IDEAM, IGAC, IAvH, Invemar IS e I. Ecosistemas continentales, costeros y marinos de Colombia [Internet]. Sistema de Información Ambiental de Colombia. 2007. 276 p. Available from: <https://www.siac.gov.co/contenido/contenido.aspx?catID=837&conID=1507>
26. Arango N, Armenteras D, Castro M, Gottsmann T, Hernández OL, Matallana CL, et al. Vacíos de conservación del sistema de parques nacionales naturales de Colombia desde una perspectiva ecorregional. 2003. 62 p.
27. Barrera JI, Contreras SM, Garzón NV, Moreno AC, Montoya SP. Manual para la restauración ecológica de los ecosistemas disturbados del Distrito Capital [Internet]. 2010. 402 p. Available from: http://oab.ambientebogota.gov.co/resultado_busquedas.php?AA_SL_Session=8cf97c692bfb8688eaf05115108c7ab8&x=5473
28. Hernández-Jaramillo A, Gonzales-M R, Villegaz F, Martinez S. Bosque seco tropical. Monitoreo comunitario de la biodiversidad. Cuenca río Cañas. 2010. 42 p.
29. Németh A, Dernovics M. Effective selenium detoxification in the seed proteins of a hyperaccumulator plant: The analysis of selenium-containing proteins of monkeypot nut (*Lecythis minor*) seeds. *J Biol Inorg Chem*. 2015;20(1):23–33. DOI: 10.1007/s00775-014-1206-6
30. Gladyshev VN, Hatfield DL. Selenocysteine-containing proteins in mammals. *J Biomed Sci*. 1999;6:151–60. DOI: 10.1007/BF02255899
31. Preedy V. Selenium: Chemistry, Analysis, Function and Effects - Google Libros [Internet]. 2015 [cited 2020 Oct 5]. 666 p. Available from: <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=h3ZwCgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR1&dq=Selenium+Chemistry,+Analysis,+Function+and+Effects.+Food+and+Nutritional+Components+in+Focus&ots=p6>

WpGGAhtT&sig=KYu2u1MT07pRYpC54rhd8aMMwH4#v=onepage&q=Selenium Chemistry%2C Analysis

32. FAO. Ecosistemas, biodiversidad, recursos genéticos | Objetivos de Desarrollo Sostenible [Internet]. 2015 [cited 2020 Oct 5]. Available from: <http://www.fao.org/sustainable-development-goals/overview/fao-and-post-2015/ecosystems-biodiversity-genetics/es/>
33. Aguilar R, Ashworth L, Galetto L, Aizen MA. Plant reproductive susceptibility to habitat fragmentation: Review and synthesis through a meta-analysis. *Ecol Lett*. 2006;9:968–80. DOI: 10.1111/j.1461-0248.2006.00927.x
34. Crandall KA, Bininda-Emonds ORR, Mace GM, Wayne RK. Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends Ecol Evol*. 2014;15(7):290–5. DOI: 10.1098/rspb.1999.0918
35. Smith RD, Maltby E. Using the Ecosystem Approach to Implement the Convention on Biological Diversity Key Issues and Case Studies [Internet]. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK; 2003. 118 p. Available from: www.iucn.org/themes.cemwww.iucn.org/bookstore
36. BEER, J; HARVEY, C; IBRAHIM, M; HARMAND, JM; SOMARRIBA, E; JIMENEZ F. Servicios ambientales de los sistemas agroforestales. *Agroforestería en las Américas*. 2003;10(37–28).
37. Belcher B, Ruíz-Pérez M, Achdiawan R. Global patterns and trends in the use and management of commercial NTFPs: Implications for livelihoods and conservation. *World Dev*. 2005;33(9):1435–52. DOI: 10.1016/j.worlddev.2004.10.007
38. Naciones Unidas. Objetivos y metas de desarrollo sostenible – Desarrollo Sostenible [Internet]. [cited 2020 Oct 7]. Available from: <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/objetivos-de-desarrollo-sostenible/>
39. CONPES. Política de Bosques. 1996;38.
40. Planeación. El plan nacional de desarrollo 2018-2022: “Pacto por Colombia, pacto por la equidad.” 2018. 212 p. DOI: 10.19053/01203053.v38.n68.2019.9924
41. Kageyama PY, Gandara FB, Souza LMI De. Conseqüências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. *Série Técnica IPEF*. 1998;12(32):65–70.
42. McKay JK, Christian CE, Harrison S, Rice KJ. “How local is local?” - A review of practical and conceptual issues in the genetics of restoration. *Restor Ecol*. 2005;13(3):432–40. DOI: 10.1111/j.1526-100X.2005.00058.x
43. Allendorf FW, Hohenlohe PA, Luikart G. Genomics and the future of conservation genetics. *Nat Rev Genet*. 2010;11(10):697–709. DOI: 10.1038/nrg2844

44. Jiménez P, Collada Collada C. Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación. *Investig Agrar Sist y Recur For*. 2000;9(4):237–48.
45. Reed DH, Frankham R. Correlation between fitness and genetic diversity. *Conserv Biol*. 2003;17(1):230–7. DOI: 10.1046/j.1523-1739.2003.01236.x
46. Schaberg PG, DeHayes DH, Hawley GJ, Nijensohn SE. Anthropogenic alterations of genetic diversity within tree populations: Implications for forest ecosystem resilience. *For Ecol Manage*. 2008;256(5):855–62. DOI: 10.1016/j.foreco.2008.06.038
47. Magdalena River Nuts. La Nuez-Natural Selium: Lecyrhisminor- Monkey Pot [Internet]. [cited 2020 Oct 7]. Available from: <http://www.magdalenarivernuts.com/lanuez.html>
48. Sánchez-Azofeifa GA, Quesada M, Rodríguez JP, Nassar JM, Stoner KE, Castillo A, et al. Research priorities for neotropical dry forests. *Biotropica*. 2005;37(4):477–85. DOI: 10.1111/j.1744-7429.2005.00066.x
49. Mooney HA, Bullock SH, Medina E. Introduction Seasonally dry tropical forests. 1995. 1–8 p.
50. BANCO DE OCCIDENTE. Bosque Seco Tropical - Colombia - Libros de la Colección Ecológica del Banco de Occidente [Internet]. Editorial I/M. On line. 2006 [cited 2020 Oct 7]. Available from: <https://www.imeditores.com/banocc/seco/cap1.htm>
51. Hernández-Camacho J, Heliodoro Sánchez Páez. Biomas terrestres de Colombia-LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA DE IBEROAMERICA. *Geriatrics*. 1992. 153–172 p. DOI: 10.2307/40117169
52. Espejo N, Morales N. Variación de la diversidad taxonómica y funcional de la avifauna en un bosque seco tropical (bs-T) en diferentes estados de sucesión en el sur del Valle del Magdalena, Huila, Colombia. *Caldasia*. 2019;41(1):108–23. DOI: 10.15446/caldasia.v41n1.71272
53. Rojas A. Verificación de coberturas de bosque seco tropical en el nodo norandino (Santander y Norte de Santander). Bogotá: Instituto de Investigación Biológica Alexander von Humboldt. 2017.
54. Prance GT, Kartawinata EK. Lecythydaceae. Vol. 21. *Flora Malesiana*; 2013. 1–118 p.
55. Calderon E, Galeano G, García N. Libro rojo de plantas Fanerógamas de Colombia Volumen 1: Chrysobalanaceae, Dichapetalaceae y Lecythydaceae. Instituto Alexander von Humboldt; 2002. 218 p.
56. Rimieri P. La diversidad genética y la variabilidad genética: Dos conceptos diferentes asociados al germoplasma y al mejoramiento genético vegetal*. *J Basic Appl Genet*. 2017;XXVIII(2):7–13.

57. Agarwal M, Shrivastava N, Padh H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep.* 2008;27(4):617–31. DOI: 10.1007/s00299-008-0507-z
58. Schlotterer C. The evolution of molecular markers: Just a matter of fashion? *Nat Rev Genet.* 2004;5(1):63–9. <https://doi.org/10.1038/nrg1249>
59. Garrido-Cardenas JA, Mesa-Valle C, Manzano-Agugliaro F. Trends in plant research using molecular markers. *Planta* [Internet]. 2018;247(3):543–57. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2829-y>
60. Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. Strategies for microsatellite isolation: A review. *Mol Ecol.* 2002;11(1):1–16. Doi: 10.1046/j.0962-1083.2001.01418.x
61. Ellegren H. Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet.* 2004;5(6):435–45. DOI: 10.1038/nrg1348
62. Annaliese S. Mason. SSR Genotyping. In *Plant Genotyping*. Jacqueline Batley, editor. Vol. 1245, *Methods in Molecular Biology*. 2015. 77–89 p. DOI: 10.1007/978-1-4939-1966-6_7
63. Pastelín Solano MC, Salinas Ruíz J, González Arnao MT, Castañeda Castro O, Galindo Tovar ME, Bello Bello JJ. Evaluation of in vitro shoot multiplication and ISSR marker based assessment of somaclonal variants at different subcultures of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks). *Physiol Mol Biol Plants.* 2019;25(2):561–7. DOI: 10.1007/s12298-019-00645-9
64. Kumar V, Yadav HK. Assessment of genetic diversity in *Lepidium sativum* L. using inter simple sequence repeat (ISSR) marker. *Physiol Mol Biol Plants* [Internet]. 2019;25(2):399–406. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12298-018-0622-4>
65. Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics.* 1994;20(2):176–83. DOI: 10.1006/geno.1994.1151
66. Verma KS, ul Haq S, Kachhwaha S, Kothari SL. RAPD and ISSR marker assessment of genetic diversity in *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad: a unique source of germplasm highly adapted to drought and high-temperature stress. *3 Biotech.* 2017;7(5):288. DOI: 10.1007/s13205-017-0918-z
67. Amom T, Tikendra L, Rahaman H, Potshangbam A, Nongdam P. Evaluation of genetic relationship between 15 bamboo species of North-East India based on ISSR marker analysis. *Mol Biol Res Commun.* 2018;7(1):7–15. DOI: 10.22099/mbrc.2018.28378.1303
68. Purayil FT, Robert GA, Gothandam KM, Kurup SS, Subramaniam S, Cheruth AJ. Genetic variability in selected date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars of United Arab Emirates using ISSR

and DAMD markers. 3 Biotech [Internet]. 2018;8(2):109. Available from: <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1108-3>

69. Buckley DP, O'Malley DM, Apsit V, Prance GT, Bawa KS. Genetics of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.: Lecythidaceae) - 1. Genetic variation in natural populations. Theor Appl Genet. 1988;76(6):923–8. DOI: 10.1007/BF00273682

70. O'Malley DM, Buckley DP, Prance GT, Bawa KS. Genetics of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.: Lecythidaceae) - 2. Mating system. Theor Appl Genet. 1988;76(6):929–32. DOI: 10.1007/BF00273683

71. REIS, A.M.M., BRAGA, A.C., LEMES, M.R., GRIBEL, R. and COLLEVATTI R. Development and characterization of microsatellite markers for the Brazil nut tree *Bertholletia excelsa* Humb. y Bonpl. (Lecythidaceae). Mol Ecol Resour. 2009;9:920–3. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2008.02479.x

72. Guidugli MC, De Campos T, De Sousa ACB, Feres JM, Sebbenn AM, Mestriner MA, et al. Development and characterization of 15 microsatellite loci for *Cariniana estrellensis* and transferability to *Cariniana legalis*, two endangered tropical tree species. Conserv Genet. 2009;10:1001–4. DOI: 10.1007/s10592-008-9672-4

73. Guidugli MC, Accoroni KAG, Mestriner MA, Contel EPB, Martinez CA, Alzate-Marin AL. Genetic characterization of 12 heterologous microsatellite markers for the giant tropical tree *Cariniana legalis* (Lecythidaceae). Genet Mol Biol. 2010;33(1):131–4. DOI: 10.1590/S1415-47572010000100022

74. Tambarussi EV, Sebbenn AM, Moreno MA, Ferraz EM, Kageyama PY, Vencovsky R. Microsatellite Markers for *Cariniana legalis* (Lecythidaceae) and Their Transferability to *C. estrellensis*. Appl Plant Sci. 2013;1(6):1200493. DOI: 10.3732/apps.1200493

75. Tambarussi E V., Boshier D, Vencovsky R, Freitas MLM, Sebbenn AM. Paternity analysis reveals significant isolation and near neighbor pollen dispersal in small *Cariniana legalis* Mart. Kuntze populations in the Brazilian Atlantic Forest. Ecol Evol. 2015;5(23):5588–600. DOI: 10.1002/ece3.1816

76. Sujii PS, Inglis PW, Ciampi AY, Solferini VN, Azevedo VCR. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Bertholletia excelsa* (Lecythidaceae) population genetic analysis. Genet Mol Res. 2013;12(4):5278–82. DOI: 10.4238/2013.November.7.2

77. Sujii PS, Martins K, Wadt LH de O, Azevedo VCR, Solferini VN. Genetic structure of *Bertholletia excelsa* populations from the Amazon at different spatial scales. Conserv Genet. 2015;16:955–64. DOI: 10.1007/s10592-015-0714-4

78. Xie H, Yuan Y, Fang X, Liu Y, Yang C, Jin J, et al. Development of EST-SSR Markers in *Barringtonia racemosa* (Lecythidaceae) and Cross-Amplification in Related Species. *Appl Plant Sci*. 2015;3(12):1500080. DOI: 10.3732/apps.1500080
79. Martos F, Lebreton G, Rivière E, Humeau L, Chevallier M-H. Microsatellites in the Tree *Foetidia mauritiana* (Lecythidaceae) and Utility in Other *Foetidia* Taxa from the Mascarene Islands. *Appl Plant Sci*. 2016;4(8):1600034. DOI: 10.3732/apps.1600034
80. Cuénin N, Flores O, Rivière E, Lebreton G, Reynaud B, Martos F. Great genetic diversity but high selfing rates and short-distance gene flow characterize populations of a tree (*Foetidia*; Lecythidaceae) in the fragmented tropical dry forest of the mascarene Islands. *J Hered*. 2019;110(3):287–99. DOI: 10.1093/jhered/esy069
81. Doyle JJ; Doyle J. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Vol. 12, Focus. 1990. p. 13–5.
82. Ramalho AB, Rossi AAB, Dardengo JFE, Zortéa KÉM, Tiago AV, Martins KC. Diversidade genética entre genótipos de *Bertholletia Excelsa* por meio de marcadores moleculares issr. *Floresta*. 2016;46(2):207–14. DOI: 10.5380/rf.v46i2.41970
83. Peakall R, Smouse PE. GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes*. 2006;6:288–95. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x
84. Peakall R, Smouse PE. GenALEX 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*. 2012;28(19):2537–9. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts460
85. Wang J sheng, He J hu, Chen H rui, Chen Y yuan, Qiao F. Genetic Diversity in Various Accessions of Pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr.] Using ISSR and SSR Markers. *Biochem Genet*. 2017;55(5–6):347–66. DOI: 10.1007/s10528-017-9803-z
86. Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol Ecol*. 2007;16(5):1099–106. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2007.03089.x
87. Yeh, F. C., Yang, R. C., & Boyle T. POPGENE version 1.32: Microsoft Windows–based freeware for population genetic analysis, quick user guide. enter Int For Res Univ Alberta, Edmonton, Alberta, Canada. 1999;1(29).
88. Raymond M. & Rousset F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered*. 1995;86:248–9.
89. Rousset F. Genepop'007: a complete reimplementaion of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol Ecol Resour*. 2008;8:103–6.

90. Nudin NFH, Ali AM, Ngah N, Mazlan NZ, Mat N, Ghani MNA, et al. ISSR marker-assisted genetic diversity analysis of *Dioscorea hispida* and selection of the best variety for sustainable production. *Comptes Rendus - Biol.* 2017;340(8):359–66. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2017.08.003>
91. Monfared MA, Samsampour D, Sharifi-Sirchi GR, Sadeghi F. Assessment of genetic diversity in *Salvadora persica* L. based on inter simple sequence repeat (ISSR) genetic marker. *J Genet Eng Biotechnol.* 2018;16(2):661–7. DOI: 10.1016/j.jgeb.2018.04.005
92. Bocanegra-González KT, Thomas E, Guillemín M-L, Alcázar Caicedo C, Moscoso Higueta LG, Gonzalez MA, et al. Diversidad y estructura genética de cuatro especies arbóreas clave del Bosque Seco Tropical en Colombia. *Caldasia.* 2019;41(1):78–91. DOI: <https://doi.org/10.15446/caldasia.v41n1.71327>
93. Carpejani AA, Pena GF, Vieira FS, Tiago PV, Rossi AAB. Genetic Diversity of *Bertholletia excelsa* Bonpl.: A Native Species of the Amazon Rainforest. *Floresta e Ambient.* 2020;27(4). <https://doi.org/10.1590/2179-8087-floram-2018-0180>.
94. Da Silva AVC, Muniz EN, Almeida CS, Da Vitória MF, Da Silva Ledo A, De Vasconcelos Melo MF, et al. Genetic diversity and sex identification in *genipa americana* L. *Trop Subtrop Agroecosystems.* 2015;18(1):81–6. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93938025010>
95. Feitosa-Alcantara RB, Silva AVC, Blank AF, Almeida CS, Alvares-Carvalho S V., Arrigoni-Blank MF. Analysis of genetic diversity of *Hyptis pectinata* (L.) Poit. plants using ISSR markers. *Genet Mol Res.* 2017;16(3). DOI: 10.4238/gmr16039603
96. Nagy S, Poczai P, Cernák I, Gorji AM, Hegedűs G, Taller J. PICcalc: An online program to calculate polymorphic information content for molecular genetic studies. *Biochem Genet.* 2012;50(9–10):670–2. DOI: 10.1007/s10528-012-9509-1
97. Aranguren Y, Briceño A, Fermin G. Assessment of the variability of Venezuelan guava landraces by microsatellites. *Acta Hort.* 2010;849:147–54. DOI: 10.17660/ActaHortic.2010.849.16
98. Chirinos-Aria MC, Jiménez JE. Transferencia de algunos marcadores moleculares microsatélites de la familia Fabaceae en tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet). *Sci Agropecu.* 2015;6(1):51–8. <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2015.01.05>
99. Gimenes MA, Hoshino AA, Barbosa AVG, Palmieri DA, Lopes CR. Characterization and transferability of microsatellite markers of the cultivated peanut (*Arachis hypogaea*). *BMC Plant Biol.* 2007;7(9):1–13. DOI:10.1186/1471-2229-7-9

100. Vieira FS, Rossi AA, Pena GF, Tiago A V., Zortéa KÉM, Schmitt KFM, et al. Genetic diversity of brazil-nut populations naturally occurring in the municipality of alta floresta, mt, brazil. *Genet Mol Res.* 2019;18(2):gmr18174. DOI: 10.4238/gmr18174
101. Mori, S. A., and Prance GT. Lecythidaceae. Part II. The zygomorphic-flowered New World genera (*Couroupita*, *Corythophora*, *Bertholletia*, *Couratari*, *Eschweilera*, & *Lecythis*). *Flora Neotrop Monogr.* 1990;21:1– 376.
102. Huang YY, Mori SA, Prance GT. A phylogeny of *Cariniana* (Lecythidaceae) based on morphological and anatomical data. *Brittonia.* 2008;60(1):69–81. <https://doi.org/10.1007/s12228-008-9014-3>
103. Mori SA, Tsou CH, Wu CC, Cronholm B, Anderberg AA. Evolution of Lecythidaceae with an emphasis on the circumscription of neotropical genera: Information from combined ndhF and trnL-F sequence data. *Am J Bot.* 2007;94(3):289–301. DOI: 10.3732/ajb.94.3.289
104. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *Am J Hum Gen.* 1980;32:314–31.
105. Ellegren H, Galtier N. Determinants of genetic diversity. *Nat Rev Genet.* 2016;17(7):422–33. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.58>
106. Fernández-Mazuecos M, Jiménez-Mejías P, Rotllan-Puig X, Vargas P. Narrow endemics to Mediterranean islands: Moderate genetic diversity but narrow climatic niche of the ancient, critically endangered *Naufraga* (Apiaceae). *Perspect Plant Ecol Evol Syst.* 2014;16(4):190–202. DOI: 10.1016/j.ppees.2014.05.003
107. Melito S, La Bella S, Martinelli F, Cammalleri I, Tuttolomondo T, Leto C, et al. Morphological, chemical, and genetic diversity of wild myrtle (*Myrtus communis* L.) populations in sicily. *Turkish J Agric For.* 2016;40(2):249–61. DOI: 10.3906/tar-1505-118
108. Jackson GC, Salas JB. Insect Visitors of *Lecythis elliptica*. *J Agric Univ Puerto Rico.* 1961;49(1):133–41. <https://doi.org/10.46429/jaupr.v49i1.13014>
109. Kramer AT, Ison JL, Ashley M V., Howe HF. The paradox of forest fragmentation genetics. *Conserv Biol.* 2008;22(4):878–85. DOI: 10.1111/j.1523-1739.2008.00944.x

Anexo 1. Matriz de datos ISSR

Locus	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Ind																									
Lo4	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
Lc8	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
LG45	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1
LBb32	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0
Lsp40	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0
Ls23	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0
Lp26	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0
LBe68	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0

Ind:Individuo

Anexo 2. Matriz de datos SSR: tamaño de alelos

SSR Muestra	Lec144		Lec172		Bex33		Lec287		Bex09		Bex22		Bet14	
Lo4	200	200	190	190	180	295	155	155	110	110	105	145	100	100
Lc8	0	0	0	0	190	190	145	200	0	0	0	0	110	110
LG45	190	190	195	195	190	190	155	205	125	125	105	145	110	110
LBb32	190	190	195	195	190	190	155	205	115	115	105	145	110	110
Lsp40	0	0	195	195	205	295	155	205	125	125	105	135	110	110
Ls23	190	190	195	195	195	195	155	205	125	125	105	145	110	110
Lp26	205	205	0	0	190	190	155	205	125	125	115	145	110	110
LBe68	205	205	195	195	190	190	160	205	125	125	105	155	110	110

Anexo 3. análisis de microsatélites realizados mediante el programa Popgene

* Population : 1 @ Locus : Lec144 *

=====

Genotypes Obs. (O) Exp. (E) (O-E)²/E 2*O*Ln(O/E)

=====

(A, A) 3 1.3636 1.9636 4.7307

(B, A) 0 1.0909 1.0909 0.0000

(B, B)	1	0.0909	9.0909	4.7958
(C, A)	0	2.1818	2.1818	0.0000
(C, B)	0	0.7273	0.7273	0.0000
(C, C)	2	0.5455	3.8788	5.1971

=====

Chi-square test for Hardy-Weinberg equilibrium :

Chi-square : 18.933333

Degree of freedom : 3

Probability : 0.000282

Likelihood ratio test for Hardy-Weinberg equilibrium :

G-square : 14.723667

Degree of freedom : 3

Probability : 0.002069

~~~~~

\* Population : 1 @ Locus : Lec172 \*

=====

| Genotypes | Obs. (O) | Exp. (E) | $(O-E)^2/E$ | $2*O*Ln(O/E)$ |
|-----------|----------|----------|-------------|---------------|
|-----------|----------|----------|-------------|---------------|

=====

|        |   |        |        |        |
|--------|---|--------|--------|--------|
| (A, A) | 1 | 0.0909 | 9.0909 | 4.7958 |
| (B, A) | 0 | 1.8182 | 1.8182 | 0.0000 |

(B, B)      5   4.0909   0.2020   2.0067

=====

Chi-square test for Hardy-Weinberg equilibrium :

Chi-square :      11.111111

Degree of freedom :   1

Probability :      0.000858

Likelihood ratio test for Hardy-Weinberg equilibrium :

G-square :      6.802498

Degree of freedom :   1

Probability :      0.009103

~~~~~

* Population : 1 @ Locus : Bex33 *

=====

Genotypes	Obs. (O)	Exp. (E)	$(O-E)^2/E$	$2*O*\ln(O/E)$
(A, A)	0	0.0000	0.0000	0.0000
(B, A)	0	0.6667	0.6667	0.0000
(B, B)	5	3.0000	1.3333	5.1083
(C, A)	0	0.1333	0.1333	0.0000
(C, B)	0	1.3333	1.3333	0.0000
(C, C)	1	0.0667	13.0667	5.4161
(D, A)	0	0.0667	0.0667	0.0000
(D, B)	0	0.6667	0.6667	0.0000
(D, C)	0	0.1333	0.1333	0.0000
(D, D)	0	0.0000	0.0000	0.0000
(E, A)	1	0.1333	5.6333	4.0298
(E, B)	0	1.3333	1.3333	0.0000
(E, C)	0	0.2667	0.2667	0.0000
(E, D)	1	0.1333	5.6333	4.0298
(E, E)	0	0.0667	0.0667	0.0000

=====

Chi-square test for Hardy-Weinberg equilibrium :

Chi-square : 30.333333

Degree of freedom : 10

Probability : 0.000755

Likelihood ratio test for Hardy-Weinberg equilibrium :

G-square : 18.583969

Degree of freedom : 10

Probability : 0.045876

~~~~~

\* Population : 1 @ Locus : Lec287 \*

=====

Genotypes Obs. (O) Exp. (E) (O-E)<sup>2</sup>/E 2\*O\*Ln(O/E)

=====

|        |   |        |        |         |
|--------|---|--------|--------|---------|
| (A, A) | 0 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000  |
| (B, A) | 0 | 0.4667 | 0.4667 | 0.0000  |
| (B, B) | 1 | 1.4000 | 0.1143 | -0.6729 |
| (C, A) | 0 | 0.0667 | 0.0667 | 0.0000  |
| (C, B) | 0 | 0.4667 | 0.4667 | 0.0000  |
| (C, C) | 0 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000  |

|        |   |        |         |        |
|--------|---|--------|---------|--------|
| (D, A) | 1 | 0.0667 | 13.0667 | 5.4161 |
| (D, B) | 0 | 0.4667 | 0.4667  | 0.0000 |
| (D, C) | 0 | 0.0667 | 0.0667  | 0.0000 |
| (D, D) | 0 | 0.0000 | 0.0000  | 0.0000 |
| (E, A) | 0 | 0.4000 | 0.4000  | 0.0000 |
| (E, B) | 5 | 2.8000 | 1.7286  | 5.7982 |
| (E, C) | 1 | 0.4000 | 0.9000  | 1.8326 |
| (E, D) | 0 | 0.4000 | 0.4000  | 0.0000 |
| (E, E) | 0 | 1.0000 | 1.0000  | 0.0000 |

=====

Chi-square test for Hardy-Weinberg equilibrium :

Chi-square : 19.142857

Degree of freedom : 10

Probability : 0.038485

Likelihood ratio test for Hardy-Weinberg equilibrium :

G-square : 12.373922

Degree of freedom : 10

Probability : 0.260810

~~~~~

* Population : 1 @ Locus : Bex09 *

=====

Genotypes	Obs. (O)	Exp. (E)	$(O-E)^2/E$	$2*O*Ln(O/E)$
-----------	----------	----------	-------------	---------------

=====

(A, A)	1	0.0769	11.0769	5.1299
(B, A)	0	0.3077	0.3077	0.0000
(B, B)	1	0.0769	11.0769	5.1299
(C, A)	0	1.5385	1.5385	0.0000
(C, B)	0	1.5385	1.5385	0.0000
(C, C)	5	3.4615	0.6838	3.6772

=====

Chi-square test for Hardy-Weinberg equilibrium :

Chi-square : 26.222222

Degree of freedom : 3

Probability : 0.000009

Likelihood ratio test for Hardy-Weinberg equilibrium :

G-square : 13.937045

Degree of freedom : 3

Probability : 0.002992

~~~~~

\* Population : 1 @ Locus : Bex22 \*

=====

| Genotypes | Obs. (O) | Exp. (E) | (O-E) <sup>2</sup> /E | 2*O*Ln(O/E) |
|-----------|----------|----------|-----------------------|-------------|
|-----------|----------|----------|-----------------------|-------------|

=====

|        |   |        |        |        |
|--------|---|--------|--------|--------|
| (A, A) | 0 | 1.1538 | 1.1538 | 0.0000 |
| (B, A) | 0 | 0.4615 | 0.4615 | 0.0000 |
| (B, B) | 0 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| (C, A) | 1 | 0.4615 | 0.6282 | 1.5464 |
| (C, B) | 0 | 0.0769 | 0.0769 | 0.0000 |
| (C, C) | 0 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| (D, A) | 4 | 2.3077 | 1.2410 | 4.4004 |

|        |   |        |        |        |
|--------|---|--------|--------|--------|
| (D, B) | 1 | 0.3846 | 0.9846 | 1.9110 |
| (D, C) | 0 | 0.3846 | 0.3846 | 0.0000 |
| (D, D) | 0 | 0.7692 | 0.7692 | 0.0000 |
| (E, A) | 1 | 0.4615 | 0.6282 | 1.5464 |
| (E, B) | 0 | 0.0769 | 0.0769 | 0.0000 |
| (E, C) | 0 | 0.0769 | 0.0769 | 0.0000 |
| (E, D) | 0 | 0.3846 | 0.3846 | 0.0000 |
| (E, E) | 0 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |

=====

Chi-square test for Hardy-Weinberg equilibrium :

Chi-square : 6.866667

Degree of freedom : 10

Probability : 0.737970

Likelihood ratio test for Hardy-Weinberg equilibrium :

G-square : 9.404153

Degree of freedom : 10

Probability : 0.494225

~~~~~

* Population : 1 @ Locus : Bet14 *

=====

Genotypes	Obs. (O)	Exp. (E)	$(O-E)^2/E$	$2*O*Ln(O/E)$
-----------	----------	----------	-------------	---------------

=====

(A, A)	1	0.0667	13.0667	5.4161
--------	---	--------	---------	--------

(B, A)	0	1.8667	1.8667	0.0000
--------	---	--------	--------	--------

(B, B)	7	6.0667	0.1436	2.0034
--------	---	--------	--------	--------

=====

Chi-square test for Hardy-Weinberg equilibrium :

Chi-square : 15.076923

Degree of freedom : 1

Probability : 0.000103

Likelihood ratio test for Hardy-Weinberg equilibrium :

G-square : 7.419512

Degree of freedom : 1

Probability : 0.006452

~~~~~

Allele Frequency of population 1 :

=====  
=====

| Allele \ Locus | Lec144 | Lec172 | Bex33 | Lec287 | Bex09 | Bex22 | Bet14 |
|----------------|--------|--------|-------|--------|-------|-------|-------|
|----------------|--------|--------|-------|--------|-------|-------|-------|

=====  
=====

|          |        |        |        |        |        |        |        |
|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Allele A | 0.5000 | 0.1667 | 0.0625 | 0.0625 | 0.1429 | 0.4286 | 0.1250 |
|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|

|          |        |        |        |        |        |        |        |
|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Allele B | 0.1667 | 0.8333 | 0.6250 | 0.4375 | 0.1429 | 0.0714 | 0.8750 |
|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|

|          |        |        |        |        |        |  |  |
|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--|--|
| Allele C | 0.3333 | 0.1250 | 0.0625 | 0.7143 | 0.0714 |  |  |
|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--|--|

|          |  |        |        |        |  |  |  |
|----------|--|--------|--------|--------|--|--|--|
| Allele D |  | 0.0625 | 0.0625 | 0.3571 |  |  |  |
|----------|--|--------|--------|--------|--|--|--|

|          |  |        |        |        |  |  |  |
|----------|--|--------|--------|--------|--|--|--|
| Allele E |  | 0.1250 | 0.3750 | 0.0714 |  |  |  |
|----------|--|--------|--------|--------|--|--|--|

=====  
=====

Summary Statistics of population 1 :

\*\*\*\*\*

\*\*\*

\*\*

\*\*

\*\*

Summary of Genic Variation Statistics for All Loci

\*\*

\*\*

[See Nei (1987) Molecular Evolutionary Genetics (p. 176-187)]

\*\*

\*\*

\*\*

\*\*\*\*\*

\*\*\*

=====

| Locus | Sample Size | na* | ne* | I* |
|-------|-------------|-----|-----|----|
|-------|-------------|-----|-----|----|

=====

|        |    |        |        |        |
|--------|----|--------|--------|--------|
| Lec144 | 12 | 3.0000 | 2.5714 | 1.0114 |
|--------|----|--------|--------|--------|

|        |    |        |        |        |
|--------|----|--------|--------|--------|
| Lec172 | 12 | 2.0000 | 1.3846 | 0.4506 |
|--------|----|--------|--------|--------|

|       |    |        |        |        |
|-------|----|--------|--------|--------|
| Bex33 | 16 | 5.0000 | 2.3273 | 1.1602 |
|-------|----|--------|--------|--------|

|        |    |        |        |        |
|--------|----|--------|--------|--------|
| Lec287 | 16 | 5.0000 | 2.9091 | 1.2493 |
|--------|----|--------|--------|--------|

|       |    |        |        |        |
|-------|----|--------|--------|--------|
| Bex09 | 14 | 3.0000 | 1.8148 | 0.7963 |
|-------|----|--------|--------|--------|

|       |    |        |        |        |
|-------|----|--------|--------|--------|
| Bex22 | 14 | 5.0000 | 3.0625 | 1.2964 |
|-------|----|--------|--------|--------|

Bet14 16 2.0000 1.2800 0.3768

Mean 14 3.5714 2.1928 0.9058

St. Dev 1.3973 0.7142 0.3754

=====

\* na = Observed number of alleles

\* ne = Effective number of alleles [Kimura and Crow (1964)]

\* I = Shannon's Information index [Lewontin (1972)]

\*\*\*\*\*

\*\*\*

\*\*

\*\*

\*\*

Summary of Heterozygosity Statistics for All Loci

\*\*

\*\*

\*\*

\*\*\*\*\*

\*\*\*

=====

Locus Sample Size Obs\_Het Exp\_Het\* Nei\*\* Ave\_Het

=====

Lec144 12 0.0000 0.6667 0.6111 0.6111

|         |    |        |        |        |        |
|---------|----|--------|--------|--------|--------|
| Lec172  | 12 | 0.0000 | 0.3030 | 0.2778 | 0.2778 |
| Bex33   | 16 | 0.2500 | 0.6083 | 0.5703 | 0.5703 |
| Lec287  | 16 | 0.8750 | 0.7000 | 0.6562 | 0.6562 |
| Bex09   | 14 | 0.0000 | 0.4835 | 0.4490 | 0.4490 |
| Bex22   | 14 | 1.0000 | 0.7253 | 0.6735 | 0.6735 |
| Bet14   | 16 | 0.0000 | 0.2333 | 0.2188 | 0.2188 |
| Mean    | 14 | 0.3036 | 0.5315 | 0.4938 | 0.4938 |
| St. Dev |    | 0.4440 | 0.1973 | 0.1838 | 0.1838 |

=====

\* Expected homozygosity and heterozygosity were computed using Levene (1949)

\*\* Nei's (1973) expected heterozygosity

The number of polymorphic loci is : 7

The percentage of polymorphic loci is : 100.00 %

Wright's (1978) fixation index (Fis) as a measure of heterozygote deficiency or excess

=====

=====

| Allele \ Locus | Lec144 | Lec172 | Bex33 | Lec287 | Bex09 | Bex22 | Bet14 |
|----------------|--------|--------|-------|--------|-------|-------|-------|
|----------------|--------|--------|-------|--------|-------|-------|-------|

=====  
=====

|          |        |        |         |         |        |         |        |
|----------|--------|--------|---------|---------|--------|---------|--------|
| Allele A | 1.0000 | 1.0000 | -0.0667 | -0.0667 | 1.0000 | -0.7500 | 1.0000 |
| Allele B | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000  | -0.2698 | 1.0000 | -0.0769 | 1.0000 |
| Allele C | 1.0000 | ****   | 1.0000  | -0.0667 | 1.0000 | -0.0769 | ****   |
| Allele D | ****   | ****   | -0.0667 | -0.0667 | ****   | -0.5556 | ****   |
| Allele E | ****   | ****   | -0.1429 | -0.6000 | ****   | -0.0769 | ****   |
| Total    | 1.0000 | 1.0000 | 0.5616  | -0.3333 | 1.0000 | -0.4848 | 1.0000 |

=====  
=====

\*\*\*\*\*

\*\*\*

\*\*

\*\*

\*\*

The Ewens-Watterson Test for Neutrality

\*\*

\*\*

[See Manly (1985) 'The Statistics of Natural Selection' (p.272-282)]

\*\*

\*\*

\*\*

\*\*\*\*\*

\*\*\*

Population ID : 1

Population Name : none

=====  
=====

| Locus | n | k | Obs. F | Min F | Max F | Mean* | SE* | L95* | U95* |
|-------|---|---|--------|-------|-------|-------|-----|------|------|
|-------|---|---|--------|-------|-------|-------|-----|------|------|

=====  
=====

|        |    |   |        |        |        |        |        |        |        |
|--------|----|---|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Lec144 | 12 | 3 | 0.3889 | 0.3333 | 0.7222 | 0.5130 | 0.0124 | 0.3472 | 0.7083 |
| Lec172 | 12 | 2 | 0.7222 | 0.5000 | 0.8472 | 0.6953 | 0.0176 | 0.5000 | 0.8472 |
| Bex33  | 16 | 5 | 0.4297 | 0.2000 | 0.6250 | 0.3306 | 0.0062 | 0.2266 | 0.5000 |
| Lec287 | 16 | 5 | 0.3438 | 0.2000 | 0.6250 | 0.3343 | 0.0072 | 0.2266 | 0.5781 |
| Bex09  | 14 | 3 | 0.5510 | 0.3333 | 0.7551 | 0.5264 | 0.0156 | 0.3367 | 0.7449 |
| Bex22  | 14 | 5 | 0.3265 | 0.2000 | 0.5918 | 0.3224 | 0.0056 | 0.2245 | 0.5306 |
| Bet14  | 16 | 2 | 0.7812 | 0.5000 | 0.8828 | 0.7235 | 0.0194 | 0.5000 | 0.8828 |

=====  
=====

**Anexo 4.** Análisis de marcadores microsatélites utilizando el programa genepop

Genepop 4.7.5, Basic data for each locus in each population

File: 171549 (SSR L\_minor )

Number of populations detected : 1

Number of loci detected : 7

'Expected' numbers of homozygotes or heterozygotes  
are computed using Levene's correction

Fis: computed as in Weir & Cockerham (1984);  
also as in Robertson & Hill (1984).

=====  
Detailed analyses  
=====

Pop: LBe68 Locus: Lec144  
-----

Genotypic matrix:

1 2 3

1 3

2 0 1

3 0 0 2

Genotypes Obs. Expected

|      |   |        |
|------|---|--------|
| 1, 1 | 3 | 1.3636 |
| 2, 1 | 0 | 1.0909 |
| 2, 2 | 1 | 0.0909 |
| 3, 1 | 0 | 2.1818 |
| 3, 2 | 0 | 0.7273 |
| 3, 3 | 2 | 0.5455 |

Expected number of homozygotes : 2.0000  
 Observed number of homozygotes : 6  
 Expected number of heterozygotes: 4.0000  
 Observed number of heterozygotes: 0

Allele frequencies and Fis:

|        |              | Fis       |        |     |  |
|--------|--------------|-----------|--------|-----|--|
| Allele | Sample count | Frequency | W&C    | R&H |  |
| 1      | 6            | 0.5000    | 1.0000 |     |  |
| 2      | 2            | 0.1667    | 1.0000 |     |  |
| 3      | 4            | 0.3333    | 1.0000 |     |  |
| Tot    | 12           | 1.0000    | 1.2000 |     |  |

Pop: LBe68 Locus: Lec172

Genotypic matrix:

|       |     |
|-------|-----|
| 1     | 2   |
| ----- |     |
| 1     | 1   |
| 2     | 0 5 |

| Genotypes | Obs. | Expected |
|-----------|------|----------|
| 1, 1      | 1    | 0.0909   |
| 2, 1      | 0    | 1.8182   |
| 2, 2      | 5    | 4.0909   |

Expected number of homozygotes : 4.1818  
 Observed number of homozygotes : 6  
 Expected number of heterozygotes: 1.8182  
 Observed number of heterozygotes: 0

Allele frequencies and Fis:

-----

| Fis    |              |           |        |     |
|--------|--------------|-----------|--------|-----|
| -----  |              |           |        |     |
| Allele | Sample count | Frequency | W&C    | R&H |
| 1      | 2            | 0.1667    | 1.0000 |     |
| 2      | 10           | 0.8333    | 1.0000 |     |
| Tot    | 12           | 1.0000    | 1.2000 |     |

Pop: LBe68 Locus: Bex33

Genotypic matrix:

|   | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 0 |   |   |   |   |
| 2 | 0 | 5 |   |   |   |
| 3 | 0 | 0 | 1 |   |   |
| 4 | 0 | 0 | 0 | 0 |   |
| 5 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |

| Genotypes | Obs. | Expected |
|-----------|------|----------|
| 1,1       | 0    | 0.0000   |
| 2,1       | 0    | 0.6667   |
| 2,2       | 5    | 3.0000   |
| 3,1       | 0    | 0.1333   |
| 3,2       | 0    | 1.3333   |
| 3,3       | 1    | 0.0667   |
| 4,1       | 0    | 0.0667   |
| 4,2       | 0    | 0.6667   |
| 4,3       | 0    | 0.1333   |
| 4,4       | 0    | 0.0000   |
| 5,1       | 1    | 0.1333   |
| 5,2       | 0    | 1.3333   |
| 5,3       | 0    | 0.2667   |
| 5,4       | 1    | 0.1333   |
| 5,5       | 0    | 0.0667   |

Expected number of homozygotes : 3.1333  
 Observed number of homozygotes : 6  
 Expected number of heterozygotes: 4.8667  
 Observed number of heterozygotes: 2

Allele frequencies and Fis:

| Fis    |              |           |     |     |
|--------|--------------|-----------|-----|-----|
| -----  |              |           |     |     |
| Allele | Sample count | Frequency | W&C | R&H |

|     |    |        |         |
|-----|----|--------|---------|
| 1   | 1  | 0.0625 | 0.0000  |
| 2   | 10 | 0.6250 | 1.0000  |
| 3   | 2  | 0.1250 | 1.0000  |
| 4   | 1  | 0.0625 | 0.0000  |
| 5   | 2  | 0.1250 | -0.0769 |
| Tot | 16 | 0.6056 | 0.3393  |

---

Pop: LBe68 Locus: Lec287

---

Genotypic matrix:

|       |   |   |   |   |   |
|-------|---|---|---|---|---|
| 1     | 2 | 3 | 4 | 5 |   |
| <hr/> |   |   |   |   |   |
| 1     | 0 |   |   |   |   |
| 2     | 0 | 1 |   |   |   |
| 3     | 0 | 0 | 0 |   |   |
| 4     | 1 | 0 | 0 | 0 |   |
| 5     | 0 | 5 | 1 | 0 | 0 |

Genotypes Obs. Expected

|     |   |        |
|-----|---|--------|
| 1,1 | 0 | 0.0000 |
| 2,1 | 0 | 0.4667 |
| 2,2 | 1 | 1.4000 |
| 3,1 | 0 | 0.0667 |
| 3,2 | 0 | 0.4667 |
| 3,3 | 0 | 0.0000 |
| 4,1 | 1 | 0.0667 |
| 4,2 | 0 | 0.4667 |
| 4,3 | 0 | 0.0667 |
| 4,4 | 0 | 0.0000 |
| 5,1 | 0 | 0.4000 |
| 5,2 | 5 | 2.8000 |
| 5,3 | 1 | 0.4000 |
| 5,4 | 0 | 0.4000 |
| 5,5 | 0 | 1.0000 |

Expected number of homozygotes : 2.4000  
Observed number of homozygotes : 1  
Expected number of heterozygotes: 5.6000  
Observed number of heterozygotes: 7

Allele frequencies and Fis:

---

Fis

---

|        |              |           |     |     |
|--------|--------------|-----------|-----|-----|
| Allele | Sample count | Frequency | W&C | R&H |
|--------|--------------|-----------|-----|-----|

|     |    |         |         |
|-----|----|---------|---------|
| 1   | 1  | 0.0625  | 0.0000  |
| 2   | 7  | 0.4375  | -0.2069 |
| 3   | 1  | 0.0625  | 0.0000  |
| 4   | 1  | 0.0625  | 0.0000  |
| 5   | 6  | 0.3750  | -0.5556 |
| Tot | 16 | -0.2727 | -0.1199 |

---

Pop: LBe68 Locus: Bex09

---

Genotypic matrix:

1 2 3

|   |   |   |   |
|---|---|---|---|
| 1 | 1 |   |   |
| 2 | 0 | 1 |   |
| 3 | 0 | 0 | 5 |

Genotypes Obs. Expected

|     |   |        |
|-----|---|--------|
| 1,1 | 1 | 0.0769 |
| 2,1 | 0 | 0.3077 |
| 2,2 | 1 | 0.0769 |
| 3,1 | 0 | 1.5385 |
| 3,2 | 0 | 1.5385 |
| 3,3 | 5 | 3.4615 |

Expected number of homozygotes : 3.6154

Observed number of homozygotes : 7

Expected number of heterozygotes: 3.3846

Observed number of heterozygotes: 0

Allele frequencies and Fis:

---

Fis

---

| Allele | Sample count | Frequency | W&C    | R&H |
|--------|--------------|-----------|--------|-----|
| 1      | 2            | 0.1429    | 1.0000 |     |
| 2      | 2            | 0.1429    | 1.0000 |     |
| 3      | 10           | 0.7143    | 1.0000 |     |
| Tot    | 14           | 1.0000    | 1.1667 |     |

---

Pop: LBe68 Locus: Bex22

---

Genotypic matrix:

1 2 3 4 5

---

```

1 0
2 0 0
3 1 0 0
4 4 1 0 0
5 1 0 0 0 0

```

| Genotypes | Obs. | Expected |
|-----------|------|----------|
| 1,1       | 0    | 1.1538   |
| 2,1       | 0    | 0.4615   |
| 2,2       | 0    | 0.0000   |
| 3,1       | 1    | 0.4615   |
| 3,2       | 0    | 0.0769   |
| 3,3       | 0    | 0.0000   |
| 4,1       | 4    | 2.3077   |
| 4,2       | 1    | 0.3846   |
| 4,3       | 0    | 0.3846   |
| 4,4       | 0    | 0.7692   |
| 5,1       | 1    | 0.4615   |
| 5,2       | 0    | 0.0769   |
| 5,3       | 0    | 0.0769   |
| 5,4       | 0    | 0.3846   |
| 5,5       | 0    | 0.0000   |

Expected number of homozygotes : 1.9231  
 Observed number of homozygotes : 0  
 Expected number of heterozygotes: 5.0769  
 Observed number of heterozygotes: 7

Allele frequencies and Fis:

---

| Allele | Sample count | Fis       |         | W&C     | R&H |
|--------|--------------|-----------|---------|---------|-----|
|        |              | Frequency |         |         |     |
| 1      | 6            | 0.4286    | -0.7143 |         |     |
| 2      | 1            | 0.0714    | 0.0000  |         |     |
| 3      | 1            | 0.0714    | 0.0000  |         |     |
| 4      | 5            | 0.3571    | -0.5000 |         |     |
| 5      | 1            | 0.0714    | 0.0000  |         |     |
| Tot    | 14           |           | -0.4237 | -0.1875 |     |

---

Pop: LBe68 Locus: Bet14

---

Genotypic matrix:

```

1 2

```

1 1  
2 0 7

| Genotypes | Obs. | Expected |
|-----------|------|----------|
| 1,1       | 1    | 0.0667   |
| 2,1       | 0    | 1.8667   |
| 2,2       | 7    | 6.0667   |

Expected number of homozygotes : 6.1333  
 Observed number of homozygotes : 8  
 Expected number of heterozygotes: 1.8667  
 Observed number of heterozygotes: 0

Allele frequencies and Fis:

| -----  |              |           |        |     |
|--------|--------------|-----------|--------|-----|
| Fis    |              |           |        |     |
| -----  |              |           |        |     |
| Allele | Sample count | Frequency | W&C    | R&H |
| 1      | 2            | 0.1250    | 1.0000 |     |
| 2      | 14           | 0.8750    | 1.0000 |     |
| Tot    | 16           | 1.0000    | 1.1429 |     |

-----

Tables of allelic frequencies for each locus:

Locus: Lec144

| Pop   | Alleles |       |       | Genes |
|-------|---------|-------|-------|-------|
| ----- |         |       |       |       |
|       | 1       | 2     | 3     |       |
| LBe68 | 0.500   | 0.167 | 0.333 | 12    |

Locus: Lec172

| Pop   | Alleles |       | Genes |
|-------|---------|-------|-------|
| ----- |         |       |       |
|       | 1       | 2     |       |
| LBe68 | 0.167   | 0.833 | 12    |

Locus: Bex33

| Pop   | Alleles |       |       |       |       | Genes |
|-------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|
| ----- |         |       |       |       |       |       |
|       | 1       | 2     | 3     | 4     | 5     |       |
| LBe68 | 0.062   | 0.625 | 0.125 | 0.062 | 0.125 | 16    |

Locus: Lec287

-----

| Pop   | Alleles |       |       |       |       | Genes |
|-------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|
|       | 1       | 2     | 3     | 4     | 5     |       |
| LBe68 | 0.062   | 0.438 | 0.062 | 0.062 | 0.375 | 16    |

Locus: Bex09

-----

| Pop   | Alleles |       |       | Genes |
|-------|---------|-------|-------|-------|
|       | 1       | 2     | 3     |       |
| LBe68 | 0.143   | 0.143 | 0.714 | 14    |

Locus: Bex22

-----

| Pop   | Alleles |       |       |       |       | Genes |
|-------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|
|       | 1       | 2     | 3     | 4     | 5     |       |
| LBe68 | 0.429   | 0.071 | 0.071 | 0.357 | 0.071 | 14    |

Locus: Bet14

-----

| Pop   | Alleles |       | Genes |
|-------|---------|-------|-------|
|       | 1       | 2     |       |
| LBe68 | 0.125   | 0.875 | 16    |