



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
UNIDAD DURANGO

DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD MOLECULAR Y FITOQUÍMICA DE
***Cedrela odorata* L. CULTIVADA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS EN
BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

M. en C. Samantha del Rocío Mariscal Lucero



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14-BIS

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Durango, Dgo. siendo las 15:25 horas del día 8 del mes de Diciembre del 2014 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del: CIIDIR-IPN Unidad Durango para examinar la tesis titulada:
Estudio de la variabilidad molecular y fitoquímica de Cedrela odorata L. cultivada

Presentada por el alumno:

MARISCAL

LUCERO

SAMANTHA DEL ROCÍO

Apellido paterno

Apellido materno

Nombre(s)

Con registro:

A	1	1	0	3	9	2
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dra. Martha Rosales Castro

Dr. Netzahualcóyotl Mayek Pérez

Dr. Norma Almaraz Abarca

Dr. Miguel Mauricio Correa Ramirez

Dr. Isaias Chairez Hernández

Dr. J. Natividad Gurrola Reyes

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. José Antonio Avila Reyes

CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R.
UNIDAD DURANGO
I.P.N.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-13

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS
Y DESIGNACIÓN DE DIRECTOR DE TESIS

México, D.F. a 26 de Octubre del 2012

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR Durango en su sesión extraordinaria No. 1 celebrada el día 19 del mes de Enero conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

MARISCAL

LUCERO

SAMANTHA DEL ROCÍO

Apellido paterno

Apellido materno

Nombre (s)

Con registro: A 1 1 0 3 9 2

Aspirante de: DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:

Estudio de la variabilidad molecular y fitoquímica de *Cedrela odorata* L. cultivada

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:

Dra. Martha Rosales Castro y Dr. Netzahualcōyotl Mayek Pérez

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en: CIIDIR-IPN Unidad Durango

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Directores de Tesis

Dra. Martha Rosales Castro

Aspirante

Dr. Netzahualcōyotl Mayek Pérez

Presidente del Colegio

M. en C. Samantha del Rocío Mariscal Lucero

Dr. José Antonio Avila Reyes



CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R.
UNIDAD DURANGO
I.P.N.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F. el día **08** del mes de **Diciembre** del año **2014**, la que suscribe **Samantha del Rocío Mariscal Lucero** alumna del Programa de **Doctorado en Ciencias en Biotecnología**, con número de registro **A110392**, adscrita al **Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Durango. CIIDIR-IPN Unidad Durango**, manifiesta que es la autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la **Dra. Martha Rosales Castro** y del **Dr. Netzahualcóyotl Mayek Pérez** y cede los derechos del trabajo titulado **“Estudio de la variabilidad molecular y fitoquímica de *Cedrela odorata* L. cultivada”**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso de la autora y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones sam_mar9@hotmail.com, mrciidirdgo@yahoo.com y nmayeklp@yahoo.com.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

SAMANTHA DEL ROCÍO MARISCAL LUCERO

El presente trabajo que lleva por título “Estudio de la variabilidad molecular y fitoquímica de *Cedrela odorata* L. cultivada”, se realizó en el Laboratorio de Fitoquímica del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Durango del Instituto Politécnico Nacional y en el Laboratorio de Biotecnología del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Conservación y Mejoramiento de Ecosistemas Forestales del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, bajo la dirección de la Dra. Martha Rosales Castro y del Dr. Netzahualcoyotl Mayek Pérez, y fue financiado por el proyecto 2010-C01-134514 “Clones de cedro rojo tolerantes al barrenador *hypsipyla grandella* zeller en el golfo y sureste de México” del Fondo Sectorial del Consejo de Nacional de Ciencia y Tecnología – Comisión Nacional Forestal y por el Proyecto SIP20111058 “Estudio fitoquímico en árboles de cedro rojo (*Cedrela odorata*) y su relación al ataque del barrenador” del Instituto Politécnico Nacional.

Dedicatoria

A mis padres, porque les debo lo que soy... esto es para ustedes.

A mi madre por su paciencia...

A mi más grande regalo... mi pequeño Evan Lionel.

A mi esposo por su apoyo incondicional...

A mis hermanos y sobrinos por ser parte de mi vida...

INDICE

Sección	Página
GLOSARIO	i
LISTA DE ACRÓNIMOS	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE CUADROS.....	vi
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES	3
2.1 Especie de estudio: <i>Cedrela odorata</i> Linnaeus (Meliaceae)	3
2.1.1 Descripción de la especie	4
2.1.2 Distribución geográfica y hábitat	5
2.1.3 Reproducción y crecimiento.....	6
2.1.4 Plaga: <i>Hypsipyla grandella</i>	7
2.1.5 Usos	11
2.1.6 Producción de madera preciosa en México	13
2.2 Compuestos fitoquímicos: Metabolitos secundarios.....	14
2.2.1 Compuestos fenólicos	16
2.2.2 Terpenos.....	21
2.2.3 Metabolitos secundarios en <i>C. odorata</i>	26
2.3 Marcadores moleculares en el estudio de la variación genética	28
2.3.1 Diversidad genética en cultivos.....	31
2.3.2 Marcadores microsatélites.....	33
2.3.3 Estudios moleculares en <i>C. odorata</i>	35
3 JUSTIFICACIÓN.....	37
4 OBJETIVOS	38
4.1 Objetivo general	38
4.2 Objetivos específicos.....	38

5	MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
5.1	Sitio de estudio.....	40
5.2	Colecta de material biológico.....	40
5.3	Caracterización fitoquímica.....	41
5.3.1	Obtención de extractos.....	41
5.3.2	Purificación de extractos.....	41
5.3.3	Evaluación de compuestos fenólicos	42
5.3.4	Evaluación de limonoides.....	43
5.3.5	Evaluación cromatográfica	43
5.3.6	Análisis de resultados.....	44
5.4	Caracterización molecular.....	44
5.4.1	Extracción de ADN.....	44
5.4.2	Determinación de la integridad del ADN por electroforesis	45
5.4.3	Cuantificación del ADN obtenido	45
5.4.4	Amplificación de microsatélites	46
5.4.5	Análisis de fragmentos automatizados	48
5.4.6	Análisis de datos.....	48
5.5	Seguimiento fitoquímico de árboles de <i>C. odorata</i> en diferentes plantaciones.	49
5.5.1	Sitios de estudio	49
5.5.2	Colecta de material biológico y desarrollo experimental	51
5.5.3	Análisis de datos.....	52
6	RESULTADOS	53
6.1	Caracterización fitoquímica.....	53
6.1.1	Evaluación de compuestos fenólicos	54
6.1.2	Evaluación de limonoides.....	56
6.1.3	Análisis de datos de la caracterización fitoquímica	57
6.1.4	Evaluación cromatográfica	57
6.2	Caracterización molecular.....	62
6.2.1	Integridad del ADN obtenido	63
6.2.2	Amplificación de los microsatélites.....	63
6.2.3	Análisis de fragmentos automatizados.	65
6.2.4	Variabilidad genética.....	70

6.2.5	Frecuencias alélicas	73
6.2.6	Equilibrio de Hardy-Weinberg.....	77
6.2.7	Equilibrio de ligamiento	78
6.2.8	Endogamia.....	78
6.2.9	Estadístico F_{ST} total y flujo genético	79
6.2.10	Análisis de varianza molecular	80
6.2.11	Análisis de agrupamiento de las seis áreas de muestreo.....	80
6.2.12	Determinación del numero de poblaciones de <i>C. odorata</i>	81
6.3	Seguimiento de individuos de <i>C. odorata</i> en las diferentes plantaciones.	82
6.3.1	Análisis de fenoles	83
6.3.2	Análisis de limonoides	87
6.3.3	Variables registradas en las cuatro plantaciones.....	92
6.3.4	Correlación entre variables	95
6.3.5	Análisis de agrupamiento de los individuos de <i>C. odorata</i> de las tres plantaciones.	97
6.4	Selección de individuos para su conservación y mejoramiento	101
7	DISCUSIÓN.....	102
7.1	Variabilidad fitoquímica	102
7.2	Variabilidad molecular	105
7.3	Asociación de los compuestos fitoquímicos entre el crecimiento maderable y el ataque al barrenador	109
7.4	Selección de individuos para su selección y mejoramiento.....	111
8	CONCLUSIONES	113
9	RECOMENDACIONES	114
10	BIBLIOGRAFÍA	115

GLOSARIO

Ácido desoxirribonucleico (ADN): es un ácido nucleico que contiene instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los organismos vivos y algunos virus, es responsable de la transmisión hereditaria.

Alelo: es cada una de las formas alternativas que presenta un gen, que ocupa la misma posición en cada par de cromosomas homólogos, se diferencia en su secuencia y que se puede manifestar en modificaciones concretas de la función de ese gen.

Conservación ex situ: consiste en el mantenimiento de algunos componentes de la biodiversidad fuera de sus hábitats naturales.

Diversidad genética: es el número total de características genéticas dentro de cada especie.

Ensayo de procedencias: es una plantación de varias procedencias establecidas en tal manera que permite una comparación estadísticamente válida entre ellas en cuanto a productividad y otras características.

Fitoquímicos: es el nombre genérico con el que se conoce a una serie de sustancias que se encuentran en las plantas.

Heterocigoto: un individuo es heterocigoto, cuando los 2 genes del mismo locus de cromosomas homólogos son diferentes, ya que el individuo por ser diploide tiene en cada uno de los cromosomas homólogos un alelo distinto, que posee dos formas diferentes de un gen en particular.

Homocigoto: un individuo es homocigoto, cuando los 2 genes del locus de cromosomas homólogos son idénticos para un mismo carácter, es decir, significa

que posee dos copias idénticas de ese gen para un rasgo dado en los dos cromosomas homólogos.

Locus: en biología, un locus (loci en plural) es una posición fija en un cromosoma, como la posición de un gen o de un marcador. Una variante de la secuencia del ADN en un determinado locus se llama alelo.

Marcador molecular: un polimorfismo del ADN que se puede detectar fácilmente mediante análisis fenotípico o molecular. El marcador puede hallarse dentro de un gen o en un ADN sin función conocida. Dado que los segmentos de ADN que se encuentran próximos entre sí en un cromosoma tienden a heredarse juntos, los marcadores se suelen utilizar como maneras indirectas de seguir la pista del patrón.

Mejoramiento genético: actividades dirigidas a obtener plantas con mejores características para el interés humano (mejores genotipos).

Microsatélite: Las secuencias microsatélites son secuencias cortas repetitivas de ADN. Las secuencias microsatélites están compuestas de ADN no codificante y nos son parte de ningún gen.

Primer: una secuencia corta (de una cadena) de oligonucleótidos utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Procedencia: El término procedencia denota la fuente geográfica de la semilla o material vegetal o las plantas procedentes de tal fuente. En general cabe afirmar que las especies forestales de distribución geográfica amplia presentan considerables variaciones en punto a anatomía, morfología y fisiología.

LISTA DE ACRÓNIMOS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

CITES: Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Faunas y Flora Silvestres

CG-MS: Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

EAC: Extracto acetónico crudo

EAF1: Extracto acetónico fracción uno

EMC: Extracto metanólico crudo

EMFO: Extracto acetónico fracción orgánica

FID: Detector de ionización de flama

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución

INIFAP: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

SEMARNAT: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales

SSR: Secuencias Simples Repetidas

UV-DAD: Detector UV de arreglo de diodos

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	<i>C. odorata</i> L.	3
2	Semillas de <i>C. odorata</i> .	4
3	Hoja, flor y capsulas de <i>C. odorata</i>	4
4	Área de distribución de <i>C. odorata</i> en México	5
5	Barrenador de las meliáceas <i>Hypsipyla grandella</i> , polilla y larva	7
6	Madera de <i>C. odorata</i> .	12
7	Eventos en los cuales los metabolitos secundarios se inducen durante la respuesta de defensa de las plantas.	15
8	Flavonoides, estructura básica y tipos (Martinez-Flores <i>et al.</i> ,	19
9	Características estructurales de los principales tipos de flavonoides.	19
10	Estructura química de monoterpenos.	23
11	Estructura de algunos limonoides en meliáceas (Roy & Saraf, 2006).	24
12	Estructura de los microsatélites.	33
13	Diagrama del Análisis de fragmentos automatizado.	35
14	Diagrama de flujo general de caracterización fitoquímica y molecular.	39
15	Concentración de fenoles totales y flavonoides, en hojas de <i>C. odorata</i> , de siete procedencias.	55
16	(A) Concentración de proantocianidinas en hojas de <i>C. odorata</i> . (B) Concentración de limonoides en hojas de <i>C. odorata</i> .	56
17	Agrupamiento de los individuos de <i>C. odorata</i> , en función de los dos componentes principales.	57
18	Cromatogramas de HPLC de extractos, metanólicos fracción organic	59
19	Espectro de UV del compuesto 2 (glicósido de kaempferol)	58
20	Espectro de UV del compuesto 1 (catequina)	58
21	Análisis de clúster de la semejanza cromatográfica de los extractos fenólicos de hojas de <i>C. odorata</i> , con base al índice de Jaccard.	60
22	Cromatogramas de CG-MS. A) Fracción uno del extracto acetónico (EAF1). B) Extracto acetónico crudo (EAC)	61
23	ADN de foliolos de <i>C. odorata</i> .	63
24	Visualización de los microsatélites Ced 2, Ced 18, Ced 41, Ced 61 y Ced 131	64
25	Electroferogramas de los microsatélites Ced 2, Ced 61y Ced 131.	65
26	Patrones de distribución de la frecuencia total de los alelos de tres	74

	microsatélites de <i>C. odorata</i> .	
27	Frecuencias alélicas de tres locus microsatélites en <i>C. odorata</i> en cinco áreas de muestreo.	76
28	Dendrograma de las seis áreas de muestreo de <i>C. odorata</i> por el método.	80
29	Dendrograma de 93 individuos de <i>C. odorata</i> por el método.	81
30	Número de poblaciones inferidas a partir de delta k mediante el programa Structure.	82
31	Estructura poblacional determinada a partir del programa Structure Harvester. A partir de las frecuencias alélicas de cinco microsatélites de <i>C. odorata</i> en el sureste de México	82
32	Concentración de fenoles totales de individuos de <i>C. odorata</i> en cuatro plantaciones del sureste de México.	83
33	Concentración media de fenoles en cuatro plantaciones de <i>C. odorata</i> .	85
34	Concentración media de limonoides de individuos de <i>C. odorata</i> en las cuatro plantaciones.	88
35	Respuesta de los 12 individuos de <i>C. odorata</i> en las diferentes plantaciones.	94
36	Análisis de componentes principales de 10 variables en <i>Cedrela odorata</i> .	96
37	Agrupamiento de 36 individuos de <i>C. odorata</i> de tres plantaciones en base a 8 descriptores.	98
38	Análisis de componentes principales de 36 individuos de <i>C. odorata</i> de tres plantaciones en base a 8 descriptores.	99
39	Agrupamiento de 12 individuos de <i>C. odorata</i> de por plantación, en base a 8 descriptores	100

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Secuencias de los primers elegidos para la caracterización molecular.	46
2	Tipo de marcaje utilizado para los primers microsatélites.	47
3	Condiciones de reacción para la amplificación de los microsatélites.	47
4	Temperatura de alineamiento utilizada para la amplificación de los microsatélites.	48
5	Ubicación de las cuatro plantaciones de cedro rojo en el Golfo y Sureste de México.	50
6	Características de los sitios de las cuatro plantaciones de cedro rojo en el Golfo y Sureste de México.	50
7	Condiciones de manejo de las cuatro plantaciones de cedro rojo en el Golfo y Sureste de México.	51
8	Relación de individuos de <i>C. odorata</i> seleccionados para la caracterización fitoquímica.	53
9	Compuestos identificados por CG-MS en extractos acetónicos de hojas de <i>C. odorata</i> .	61
10	Relación de los individuos de <i>C. odorata</i> usados en la caracterización molecular y la clave correspondiente en el estudio fitoquímico.	62
11	Tamaño en pb de los microsatélites en agarosa al 2%.	63
12	93 individuos de <i>C. odorata</i> genotipificados con cinco marcadores microsatélites (Ced 2, Ced 18, Ced 41, Ced 61, Ced 131)	66
13	Numero de alelos por microsatélite.	69
14	Estimadores de la variabilidad genética de cinco microsatélite de <i>C. odorata</i> en seis áreas de muestreo.	70
15	Estimadores de la variabilidad genética de <i>C. odorata</i> por áreas de muestreo promediando los estimadores de cada microsatélite.	72
16	Promedio de los estimadores de la variabilidad genética total en la plantación de <i>C. odorata</i> .	72
17	Frecuencias alélicas de tres microsatélites en <i>C. odorata</i> en cinco áreas de muestreo.	75
18	Valores de la prueba de Chi-cuadrada para el equilibrio de Hardy-Weinberg.	77

19	Valores de la prueba de equilibrio de ligamiento por par de loci por área.	78
20	Estadísticos-F de cada microsatélite para <i>C. odorata</i> de seis áreas de muestreo en el golfo y sureste de México	78
21	Comparaciones de los valores de Fst de las áreas de muestro de <i>C. odorata</i> .	79
22	Número de migrantes por generación (Nm) entre las áreas de muestreo a partir de cinco microsatélites de <i>C. odorata</i>	79
23	Análisis de varianza molecular de cinco microsatélites en 93 individuos de <i>C. odorata</i> .	80
24	Relación de individuos seleccionados para el seguimiento de <i>C. odorata</i> en cuatro plantaciones del sureste de México	83
25	Análisis de varianza con diseño de bloques al azar del contenido fenólico de 131 individuos <i>C. odorata</i> de cuatro plantaciones forestales.	84
26	Comparación de medias de la concentración de fenoles de individuos de <i>C. odorata</i> en las cuatro plantaciones de manera global.	85
27	Análisis de varianza de la concentración de fenoles para las cuatro plantaciones	86
28	Comparación de medias de la concentración de fenoles por individuo de <i>C. odorata</i> en cada una de las plantaciones.	87
29	Análisis de varianza con diseño de bloques al azar de la concentración de limonoides de 131 individuos de <i>C. odorata</i> de 4 plantaciones forestales.	88
30	Comparación de medias de la Concentración de limonoides por plantaciones de <i>C. odorata</i> .	89
31	Comparación de medias de la concentración de limonoides de individuos de <i>C. odorata</i> en las cuatro plantaciones de manera global.	90
32	Análisis de varianza de la concentración de limonoides para las cuatro plantaciones de <i>C. odorata</i>	91
33	Comparación de medias de la concentración de limonoides por individuos de <i>C. odorata</i> en cada una de las plantaciones	92
34	Correlaciones entre variables cuantitativas evaluadas en <i>C. odorata</i>	95

35	Correlaciones entre variables cualitativas evaluadas en <i>C. odorata</i>	95
36	Análisis de correlación No. 1	96
37	Análisis de correlación canónica No.2	96
38	Relación de individuos seleccionados para el mejoramiento genético y la conservación ex situ de la diversidad genética de <i>C. odorata</i>	101

RESUMEN

Cedrela odorata (Meliaceae) es una especie forestal maderable nativa de América tropical, conocida principalmente por su madera de alta calidad. El factor limitante para establecer plantaciones exitosas con esta especie es el daño causado por el barrenador *Hypsipyla grandella*. Sin embargo, existe evidencia de la defensa y protección que compuestos fitoquímicos como los fenoles y los limonoides proporcionan a *C. odorata* contra este barrenador. Por lo que es importante estudiar a los compuestos presentes en los árboles para comprender algunos fenómenos fitoquímicos. En el presente trabajo se estudió la variabilidad fitoquímica y molecular de una plantación experimental de *C. odorata* integrada por 93 individuos procedentes de 15 localidades del golfo y sureste de México. Para la variabilidad fitoquímica se consideraron 66 individuos de siete procedencias; para determinar fenoles se evaluaron extractos metanólicos y para limonoides, extractos acetónicos. Las concentraciones de fenoles y limonoides mostraron diferencias significativas entre procedencias (Tukey, $p \leq 0.05$). Se identificó un flavonol de tipo glicósido de Kaempferol y al flavanol catequina a diferentes concentraciones por HPLC-UV-DAD. Los sesquiterpenos β -elemeno, E-cariofileno, Aromadendreno, humuleno, gama cadineno, D-germacreno, biciclogermacreno y los poli terpenos Di- α -Tocoferol y β -sitosterol se identificaron por CG-MS. La variabilidad molecular se analizó en 93 individuos. La diversidad alélica y diferenciación genética entre los individuos de la plantación se realizó por análisis de fragmentos automatizados mediante cinco marcadores microsátélites fluorescentes. Se obtuvo una buena base genética para realizar acciones de mejoramiento genético a largo plazo y reducir su vulnerabilidad ante enfermedades y ataque de plagas. Además, se observó una asociación entre los fitoquímicos estudiados con el ataque del barrenador y el crecimiento maderable; se encontró también una relación negativa entre los fenoles y el número de ataques del barrenador. Finalmente, estos estudios fitoquímicos y moleculares permitieron seleccionar cinco individuos para su conservación y mejoramiento genético.

ABSTRACT

Cedrela odorata (Meliaceae) is a tropical American native timber tree mainly known for its high-quality wood. The main limiting factor to establish successful plantations with this species has been the tree damage caused by *Hypsipyla grandella*. There is scientific evidence that relates the host and secondary metabolites, such as phenols and limonoids, with *H. grandella* attracting or repelling. Therefore, it is important to study the content and compounds of trees to understand some phytochemical phenomena. In the present study, phytochemical and molecular variability in a *C. odorata* experimental plantation of ninety three individuals from fifteen provinces (Gulf and Southeast Mexico) were evaluated. Sixty six individuals from seven provinces were evaluated for phytochemical variability. Methanol extracts were analyzed for phenols and Acetone extracts, for limonoids. Phenol and limonoid concentrations showed significant differences among provinces (Tukey, $p \leq 0.05$). A major compound was found by High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Diode Array Detection (HPLC-UV-DAD), which corresponds to a flavonol kaempferol glycoside derivative and a flavanol catechin was also detected at low concentrations. GC-MS allowed identifying the sesquiterpenoids β -elemene, E-caryophyllene, aromadendrene, α -humulene, γ -cadinene, D-germacrene, bicyclogermacrene and poly terpenoids D- α -tocopherol and β -sitosterol. Molecular variability was evaluated in ninety three individuals from fifteen provinces; fragment analysis with five fluorescent microsatellite markers was performed, thus allelic diversity and genetic differentiation were detected among plantation individuals, indicating a sufficient genetic basis for a long-term genetic improvement and reduction of their vulnerability to disease and pest attack. Moreover, an association among phytochemicals with borer attack and timber growth was observed; a negative relationship between phenols and the number of borer attacks was found. Finally, phytochemical and molecular studies developed in this work allowed to select five individuals for their conservation and genetic improvement.

1 INTRODUCCIÓN

Cedrela odorata L. (Meliaceae), es una especie forestal maderable conocida comúnmente como "Cedro rojo", nativo de América Tropical, con una amplia distribución desde los 26 ° N en México a 28 ° S en el norte de Argentina. Después de la caoba, es la segunda especie de madera preciosa más importante de la industria forestal de México y una de las más valiosas en los trópicos (Larrea *et al.*, 2008). Esta especie ha sido objeto de explotación con fines comerciales lo que ha ocasionado la disminución y fragmentación de las poblaciones naturales (Patiño, 1997). Por ello forma parte del Apéndice III del CITES y de la lista roja de la Norma Oficial Mexicana NOM- 059- SEMARNAT- 2010, como especie sujeta a protección especial (SEMARNAT, 2010). En nuestro país la producción de maderas preciosas represente tan sólo el 0.5% de la producción maderable. El factor limitante más importante para el establecimiento exitoso de plantaciones de *C. odorata* es el ataque de las larvas del barrenador *Hypsipyla grandella* (Lepidoptera: Pyralidae). Esta plaga causa su mayor daño al atacar el brote principal, lo que provoca una reducción del crecimiento y ramificación, por lo que el valor comercial del árbol se reduce o se pierde por ser inadecuado para la producción de madera (Hilje & Cornelius, 2001). A pesar de que *H. grandella* ha sido ampliamente estudiado (Cornelius & Watt, 2003; Pérez-Salicrup & Esquivel, 2008), aún no se ha desarrollado un sistema de manejo integrado. En este sentido, hay evidencia de la importancia que tienen compuestos fitoquímicos, principalmente fenoles y limonoides, en defender y disuadir a *C. odorata* del ataque del barrenador (Macías, 2001; Hilje & Cornelius, 2001), por lo que es importante conocer y estudiar los diferentes compuestos que están presentes en esta especie, como base para entender los fenómenos dirigidos por sustancias químicas.

Por lo anterior, instituciones gubernamentales de nuestro país han adoptado medidas para coordinar trabajos en favor de la conservación y mejoramiento genético de *C. odorata*, así como promover acciones para la utilización sustentable de la especie en la posibilidad de manejarlas en plantaciones y en fincas rurales,

dado que al alto valor comercial de esta meliácea proporciona ingresos importantes y sirve de sustento para algunas comunidades del trópico mexicano. De esta forma, se han establecido plantaciones experimentales a lo largo de la región del Golfo y sureste de México, en dónde se ensayan diferentes genotipos con fines de conservación y mejoramiento, con el propósito de obtener líneas mejoradas de esta especie con alto potencial productivo y resistentes a *H. grandella*.

En este sentido, los programas de mejoramiento genético deben iniciar con un acopio de germoplasma de la especie de interés, para lo cual el conocimiento de la variabilidad genética es indispensable cuando se trata de ensamblar una población base para futuras generaciones de selección, cruzamiento y mejoramiento genético. El conocimiento del nivel y distribución de la variabilidad genética dentro de un cultivo es de gran valor para diversas aplicaciones, incluyendo la caracterización molecular de variedades, cultivares e individuos (Mohammadi *et al.*, 2003). De esta forma, la diversidad genética proporciona un mayor potencial para el mejoramiento genético de cultivos (Tanksley *et al.*, 1997).

Por lo tanto, el presente trabajo propone como objetivo principal determinar la variabilidad genética de una plantación experimental de *C. odorata*, a través del empleo de cinco marcadores moleculares tipo microsatélites (SSR); así como también determinar la variabilidad fitoquímica mediante la evaluación fitoquímica de la concentración de fenoles totales, flavonoides, proantocianidinas y limonoides, en extractos de individuos de *C. odorata* de la plantación, además de la obtención de perfiles cromatográficos de fenoles por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) y de terpenos por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (CG-MS), para identificar algunos de sus compuestos comunes y mayoritarios; con el fin de establecer posibles diferencias entre ellos, que sirvan en un futuro como criterio para seleccionar individuos para su conservación y mejoramiento genético.

2 ANTECEDENTES

2.1 Especie de estudio: *Cedrela odorata* Linnaeus (Meliaceae)

La familia Meliaceae está compuesta por 51 géneros y aproximadamente 550 especies, algunas de las cuales se encuentran entre las plantas leñosas más altas del mundo, alcanzan los 70 m de altura y 15 m de diámetro a la altura del pecho. Dentro de esta familia una de las especies con mayor importancia económica en América Tropical es *Cedrela odorata* L. (Navarro *et al.*, 2004) (figura 1), conocido comúnmente en México como cedro rojo (Spanish Cedar en inglés) debido a su olor similar con el verdadero genero *Cedrus*. La aromática madera posee una alta demanda en los trópicos americanos debido a que es naturalmente resistente a las termitas y a la pudrición (Citron, 1990).

Nombres comunes en México: Cedro; Cedro mexicano; Cedro colorado, Cedro oloroso (Rep. Mex.); Acuy (l. zoque, Chis.); Calicedra (Pue.); Cedro rojo (Oax.); Culché, Kulché, K'ul-ché (l. maya, Yuc.); Chujté (Chis.); Kuché (Yuc.); Mo-ni (l. chinanteca, Oax.); Pucsun-qui-ui (l. mixe, Oax.); Icte (l. huasteca, S.L.P.).

Ubicación taxonómica:

- Reino: Plantae
- Subreino: Tracheophyta
- División: Magnoliophyta
- Clase: Magnoliopsida
- Subclase: Rosidae
- Orden: Sapindales
- Familia: Meliaceae
- Género: *Cedrela*
- Especie: *C. odorata* L.



Figura 1. *C. odorata* L (Mutis, J.C., 1783-1816)

2.1.1 Descripción de la especie

C. odorata es un árbol caducifolio, de 20 a 45 m de altura, con un diámetro a la altura del pecho de hasta 1.7 m. Se han encontrado individuos de más 60 m de altura. Presenta una copa grande, redondeada, robusta y extendida o copa achatada. Las hojas (figura 2) son alternas, paripinnadas o imparipinnadas, de 15 a 50 cm, incluyendo el pecíolo, compuestas por 10 a 22 folíolos opuestos o alternos, de 4.5 a 14 cm de largo por 2 a 4.5 cm de ancho, lanceolados u oblongos, además poseen un penetrante olor a ajo cuando se estrujan. El tronco recto, robusto, que forman a veces pequeños contrafuertes poco prominentes (1 m de alto), con ramas ascendentes o arqueadas y gruesas. La corteza externa se encuentra ampliamente fisurada con las costillas escamosas, pardo grisácea a moreno rojiza, La corteza interna es rosada-pardo amarillenta, fibrosa y amarga. Las flores (figura 2) están dispuestas en panículas terminales largas y sueltas, de 15 a 30 cm de largo; muchas flores angostas aparentemente tubulares pero con 5 pétalos, suavemente perfumadas, actinomórficas; cáliz en forma de copa, corola crema verdosa. Exhibe infrutescencias hasta de 30 cm de largo y péndulas, con cápsulas leñosas (figura 2) dehiscentes, de 2.5 a 5 cm de largo, 4 a 5 valvadas, elipsoides a oblongas, pardo verdosas a morenas, con un fuerte olor a ajo y produciendo un exudado blanquecino y acuoso cuando están inmaduras. El Fruto contiene alrededor de 20 a 40 semillas y permanece adherido al árbol por algún tiempo. Las semillas (figura 3) son aladas de 2 a 3 cm de largo, incluyendo el ala, adheridas al eje, de color café claro (Pennington & Sarukhán, 2005).



Figura 3. Hoja, flor y capsulas de *C. odorata*.



Figura 2. Semillas de *C. odorata*.

2.1.2 Distribución geográfica y hábitat

El cedro rojo es un árbol originario de América tropical, encontrándose en los bosques de las zonas de vida subtropical o tropical húmedas o estacionalmente secas; el cual se extiende desde México (latitud 26° N) hasta el norte de Argentina (latitud 28° S). Se encuentra también en las Islas del Caribe (Cuba, Isla de Pinos, Martinica, Antigua, las Antillas). No se encuentra en Chile y ha sido introducida al Viejo Mundo.

Esta especie se puede encontrar siempre de manera natural en los suelos bien drenados que sean porosos en toda su profundidad. Prospera en suelos de piedra caliza y de origen volcánico. Los árboles individuales se encuentran por lo general esparcidos en los bosques mixtos semi-siempreverdes o semi-caducifolios dominados por otras especies. Su clima es húmedo, rango de precipitación entre 2,500 y 4,000 mm anuales; cultivada aún con 5,000 mm de lluvia. La temperatura media es de 25 °C, pero tolera una máxima de 35 °C. En zonas con precipitaciones notablemente menores a 2,500 mm no desarrolla tan bien y presenta fustes cortos y frecuentemente torcidos (Citron, 1990).

En México se encuentra en la vertiente del Golfo, desde el sur de Tamaulipas y sureste de San Luis Potosí hasta la Península de Yucatán y en la vertiente del Pacífico, desde Sinaloa hasta Guerrero y en la Depresión Central y la costa de Chiapas (Pennington & Sarukhán, 2005) (figura 4).



Figura 4. Área de distribución de *C. odorata* en México (Pennington & Sarukhán, 2005).

2.1.3 Reproducción y crecimiento

El ciclo reproductivo del cedro rojo está condicionado con la temporada de crecimiento del sitio donde se encuentre. Los árboles tiran las hojas cuando han madurado totalmente los frutos de la temporada anterior, antes de florecer. A través de su distribución florece al comienzo de la temporada lluviosa: de mayo a agosto en México, en las Islas del Caribe y el norte de la América del Sur y de septiembre a octubre en Argentina.

La inflorescencia comienza cuando las nuevas hojas empiezan a expandirse, son de gran tamaño y muy ramificadas, presentan numerosas flores pequeñas, de cinco partes, simétricas y de color blanco verdusco. Los árboles son monoicos; las flores masculinas y femeninas aparecen en la misma inflorescencia, pero la especie es proterógina (las flores femeninas se abren primero). El desarrollo de las frutas toma aproximadamente de 9 a 10 meses y las frutas maduran durante la siguiente temporada seca. Los árboles comienzan a producir fruta a una edad de 10 a 12 años. La fruta, que consiste de una cápsula leñosa de buen tamaño, aparece cerca de la punta de las ramas.

Las frutas maduran, se rajan y liberan las semillas cuando aún están en el árbol materno (Citron, 1990). Se abren desde arriba hacia abajo para liberar de 40 a 50 semillas aladas. El peso de las semillas es de alrededor del 8 al 10 % del peso seco de la fruta. Un kilogramo contiene de 20,000 a 50,000 semillas. Las semillas tienen de 20 a 25 mm de largo incluyendo el ala y son dispersadas por el viento.

Las semillas se liberan durante la temporada seca. Pierden su viabilidad rápidamente si no se almacenan bajo condiciones muy secas y a una temperatura reducida. La germinación comienza con el inicio de la temporada lluviosa y es epigea. Lo normal es la germinación vigorosa y se reporta que la viabilidad de las semillas es de hasta el 90 %. La germinación es rápida y usualmente se completa en un período de 2 a 4 semanas. El desarrollo inicial de las plántulas es rápido siempre que la humedad y la luz sean adecuadas. Las plántulas cultivadas a la sombra se saturan fotosintéticamente a unas intensidades bajas y son tolerante a la sombra, pero las plántulas cultivadas bajo sol requieren de una intensidad de luz alta para su

mejor crecimiento. Las plántulas promedian 1 m en su crecimiento y desarrollan un diámetro de 10 mm o más durante el primer año bajo condiciones favorables.

2.1.4 Plaga: *Hypsipyla grandella*

El cedro rojo es una especie apta para ser cultivada en plantaciones comerciales, debido a que son de rápido crecimiento y excelente forma, además del gran valor y aceptación de su madera. Sin embargo, este potencial no se ha podido aprovechar principalmente debido al ataque de la larva *Hypsipyla grandella* (Lepidóptera: Pyralidae) (figura 5), conocido como el barrenador de las meliáceas (Arteaga & Izaguirre, 2004). Este insecto es quizás la principal plaga forestal en América Latina y el Caribe lo cual se debe a tres factores: a) bajo umbral de tolerancia, pues con apenas una larva por árbol el daño resulta severo; b) especificidad sobre miembros de la familia de las Meliaceae (13 especies neotropicales), entre las que figuran especies de alto valor económico; y c) amplia distribución geográfica, desde Florida hasta Argentina, incluyendo las islas del Caribe.



Figura 5. Barrenador de las meliáceas *Hypsipyla grandella*, polilla y larva.

H. grandella tiene un ciclo de vida que puede variar entre 30 y 141 días, dependiendo de la temperatura (entre 30 y 15 °C) y otros factores; la cantidad de huevos que la hembra deposita es de 200 a 300 huevos; y la proporción de sexos es de una hembra por cada macho. Su potencial reproductivo no es tan alto como el de otras plagas, sin embargo, los insectos que atacan meristemos no requieren altas

poblaciones para causar daños. Esta plaga puede atacar varias estructuras de los árboles (follaje, fuste y frutos), pero su mayor daño consiste en la perforación de los brotes nuevos y principalmente del brote principal, lo cual provoca la ramificación y el crecimiento se ve disminuido, y así el valor comercial del árbol resulta disminuido o anulado (Hilje & Cornelius, 2001). El ataque puede también contribuir a la mortalidad de las plántulas, especialmente en las poblaciones ya bajo estrés (Allan *et al.*, 1970). A pesar de que *H. grandella* ha sido extensamente estudiada (Hilje & Cornelius, 2001; Cornelius & Watt, 2003; Soto *et al.*, 2011), no se ha desarrollado aún un sistema de control integrado. Se ha observado que los ataques son menos frecuentes en los climas marcadamente estacionales, en donde el ciclo de reproducción de los insectos se rompe de manera natural por lo menos una vez al año. El ataque es también menos frecuente en el bosque natural, en donde los árboles huéspedes son pocos y muy esparcidos, de manera que nunca se desarrolla una alta acumulación poblacional de los insectos; es también menos frecuente bajo sombra que bajo sol pleno y en las plántulas en etapa inactiva. Los experimentos con procedencias de cedro rojo de una amplia región geográfica han mostrado que pueden variar en su respuesta al ataque y la selección esmerada podría permitir el futuro desarrollo de variedades tolerantes (Hilje & Cornelius, 2001).

El uso de insecticidas químicos contra *H. grandella* ha tenido poca aceptación por su alto costo y por factores operativos complicados, entre los que destacan la rápida penetración de la larva en el brote tras emerger del huevo, el lavado causado por las lluvias, y los métodos de aplicación por sí mismos.

Los primeros tres años son críticos en el impacto del ataque de *H. grandella* pues es donde la pérdida económica es más perjudicial, por las siguientes razones: a) la troza basal es la más valiosa; b) es frecuente que un árbol con una bifurcación baja no produzca madera de valor comercial; c) el ataque retarda el crecimiento lo que aumenta los costos de mantenimiento, los cuales son muy altos en los primeros años; y d) las evidencias indican que cuando los árboles superan unos 6 m de altura el riesgo de daño es menor (Hilje & Cornelius, 2001).

Estudios realizados por el INIFAP (2009) identificaron que cerca del 60 % de la superficie plantada con *C. odorata* en el estado de Campeche se encuentran con

daño del barrenador de las meliáceas *Hypsipyla grandella*. Según el informe de la SEMARNAT (2005), esta plaga ha sido identificada como el factor limitante más importante para el establecimiento exitoso de plantaciones de *C. odorata* en México.

De esta forma, es necesario desarrollar un enfoque de manejo integrado de plagas, el cual consiste en la combinación de varios métodos para mantener a la plaga a niveles que no causen pérdidas importantes.

Un programa de manejo integrado de plagas debe basarse en el conocimiento de aspectos bioecológicos claves de la plaga y de los árboles hospedantes, para lograr un control satisfactorio de la plaga. Asimismo, es importante resaltar las prácticas de tipo preventivo, priorizando: a) el mejoramiento genético, b) las prácticas silviculturales, c) el control biológico y d) el control etológico.

2.1.4.1 Silvicultura

Las prácticas más promisorias se refieren a la *calidad del sitio* seleccionado para plantar las meliáceas, el uso de sombra lateral y más recientemente a una combinación equilibrada de las especies de cedro rojo con otras especies de valor comercial y de crecimiento rápido pues han dado buenos resultados. Ejemplo de esas especies son: neem, laurel, roble, genízaro, teca, guanacaste, etc. (Lamb, 1966; Mayhew & Newton, 1998; Hauxwell *et al.*, 2001; Grogan *et al.*, 2002).

Es indispensable seleccionar sitios de excelente calidad, así como también un mantenimiento adecuadamente la plantación en los primeros años. Un manejo intensivo en eliminación de malezas alrededor de la base del árbol es necesario para asegurar el crecimiento rápido. Hay evidencias de que la presencia de sombra lateral reduce el daño de la plaga debido a que estimula el crecimiento vertical y la auto-poda. Así, los árboles crecen más rápidamente en altura y, de ser atacados, tienden a responder con un solo rebrote (Hilje & Cornelius, 2001).

2.1.4.2 Control biológico

Consiste en la utilización de los enemigos naturales de *H. grandella* (parasitoides, depredadores y entomopatógenos), para que regulen sus poblaciones. Hasta ahora se han identificado al menos 11 especies de parasitoides, incluyendo avispidas (familias Braconidae, Ichneumonidae y Trichogrammatidae) y moscas (Tachinidae), así como depredadores (avispidas grandes y chinches, arañas), los cuales atacan los huevos o larvas. Por su parte los entomopatógenos (virus, bacterias, hongos y nematodos) le causan enfermedades que matan a *H. grandella* (Sands & Murphy, 2001).

Los enemigos naturales presentan diferentes niveles de importancia en el control de poblaciones de *H. grandella*, pero su efecto no es suficiente para prevenir daño económico. Aunque ha habido un cierto interés en las técnicas tales como el aumento de poblaciones de enemigos naturales, el control biológico del barrenador de las meliáceas no parece ser una opción prometedora, sobre todo porque incluso las poblaciones escasas pueden causar daño económico severo.

2.1.4.3 Control etológico

El control etológico se refiere a los factores que alteran el comportamiento de *H. grandella*, incluyendo compuestos fitoquímicos atrayentes, así como repelentes y disuasivos. Se ha estudiado el aislamiento y síntesis de la feromona sexual de la hembra, la cual atrae a los machos, la cual podría colocarse en trampas y usarse como herramienta de monitoreo para aplicar medidas de combate en momentos críticos, o como método de combate directo. La otra opción son los fitoquímicos (metabolitos secundarios) que repelan a las hembras, para que no se acerquen a los árboles, o que inhiban la oviposición una vez que las hembras se posen en el árbol. Asimismo, también hay compuestos que inhiben la alimentación o el desarrollo de las larvas. Hasta ahora no se han encontrado compuestos repelentes, aunque algunos si disuaden a las larvas (Hilje & Cornelius, 2001).

2.1.4.4 Mejoramiento genético

En ensayos de diversas procedencias de cedro rojo se pretende identificar razas genéticas que sean resistentes o que puedan superar el ataque del barrenador de las meliáceas (Mayhew & Newton 1998, Watt et al. 2001).

Un buen árbol cedro rojo es aquel que puede crecer rápidamente y responde al ataque del barrenador con un rebrote o unos cuantos. Este objetivo se podría lograr mediante la selección genotípica al nivel de procedencias o de individuos. Existen notorias diferencias genéticas entre procedencias de *C. odorata*, se ha observado diferencias significativas en cuanto a la altura en diferentes procedencias de Costa Rica, así como también se encontró variación genética a nivel de la procedencia en cuanto a la dominancia apical después de un ataque simulado (decapitación) (Newton et al., 1995). De manera similar, se ha encontrado variación en el contenido foliar de compuestos fitoquímicos como los taninos y las proantocianidinas, que podrían actuar como defensas contra insectos. En todos los casos, el potencial para el mejoramiento genético es evidente, y es indispensable programas de mejoramiento bien fundamentados para aprovechar este potencial y así se podrían obtener importantes ganancias de tipo práctico (Hilje & Cornelius, 2001).

Es importante que los productores forestales eviten la utilización de semilla obtenida de zonas ecológicas diferentes de la zona en que se establecerá la plantación de cedro rojo, puesto que para varias especies tal práctica ha causado pérdidas en productividad. Esto es muy importante en especies tropicales que crecen naturalmente en ambas vertientes en América Central, pues las características genéticas de las poblaciones del Pacífico y el Atlántico son muy diferentes.

2.1.5 Usos

2.1.5.1 Uso maderable

Esta especie produce una madera preciosa aromática de excelentes características: es blanda, liviana, fuerte, duradera y fácil de trabajar (figura 6). El

duramen del cedro contiene una resina aromática y repelente a los insectos. Esta madera, es tanto resistente a la pudrición en contacto con el suelo como altamente resistente a las termitas, haciéndola adecuada para la construcción en el exterior. Preferida para muebles finos, puertas y ventanas. Gabinetes, decoración de interior, carpintería en general, construcción de barcos, cajas de puros, cubiertas y forros de embarcaciones, lambrín, parquet, triplay, chapa, ebanistería en general, postes, embalajes, aparatos de precisión (Cordero & Boshier, 2003).

Además, esta especie maderable tiene importancia artesanal en artículos torneados y esculturas. El fruto seco, con potencial artesanal, posee características muy especiales, que de acuerdo a la creatividad se pueden hacer instrumentos musicales, arreglos florales y cortinas. Es usada también por las localidades como leña, en la construcción rural y en implementos agrícolas.

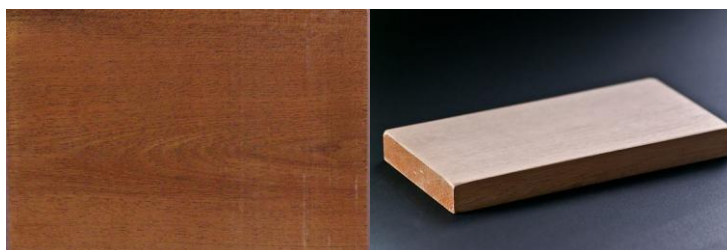


Figura 6. Madera de *C. odorata*.

2.1.5.2 Uso en medicina tradicional

En América del Sur, la infusión de la corteza es usada como remedio para diarrea, fiebre, como anti-inflamatorio, vomito, hemorragias e indigestión. En África, la decocción de la corteza es usada contra la malaria y fiebre (Kipassa, *et al.*, 2007).

En México recibe un uso medicinal en el centro y sur del país en los estados de Michoacán, Veracruz, Puebla, Oaxaca, Campeche, Yucatán y Chiapas. Se recomienda para tratar las molestias dentales, para lo cual se coloca en la parte afectada un trozo de la raíz molida. También es frecuente su utilización para dolor de estómago y parásitos intestinales, mediante el cocimiento hecho a base de raíz, tallo y hojas.

2.1.6 Producción de madera preciosa en México

El aprovechamiento y el uso de la gran diversidad de maderas de especies provenientes de árboles tropicales, ha sido una de las actividades más importantes en la economía de la zona cálida húmeda del país, particularmente en el sureste de México. La producción forestal se lleva a cabo principalmente en terrenos ejidales, seguido por los terrenos privados y unidades mixtas. Las especies económicamente más importantes en esta región son caoba, cedro rojo, chacáh, chechem, chicozapote, ébano, guanacaste, mangle y pukté. (INEGI, 1997). El cedro rojo después de la caoba (*Swietenia macrophylla*) es la especie maderable preciosa más importante en la industria forestal de México (Larrea *et al.*, 2008). A nivel nacional las maderas preciosas siempre han tenido una buena aceptación y un precio elevado en comparación de otras especies, teniendo un déficit de producción que a la fecha ha provocado una demanda insatisfecha (Ramírez *et al.*, 2008).

El sureste del país constituye la región de la cual proceden casi exclusivamente estas maderas. Para que una parcela recupere su cantidad de maderas preciosas, debe descansar por cerca de 50 años. Por lo tanto, la explotación sostenible de estos recursos requiere de grandes extensiones de selva que permitan aprovechar una parcela mientras otras se dejan en descanso. Cuando vastas regiones de selva permanecieron despobladas, fue posible que se explotara la caoba y el cedro rojo de la región sureste con un esquema de ciclos de descanso de varias décadas. La minifundización de las tierras que acompañó a los programas de colonización de los trópicos de las décadas de los sesenta y setenta, impidió mantener estos ciclos de descanso, lo que ocasionó que las plantas de caoba o cedro rojo remanentes sean escasas y de talla reducida (SEMARNAT, 2005).

En la actualidad, las maderas preciosas apenas representan medio punto porcentual de la producción maderable de México. No existe información sobre el aumento anual de la madera de este grupo pero hay indicios sobre su mal aprovechamiento (SEMARNAT, 2005). Sin embargo, en el sureste del país muchas comunidades dedicadas a la producción maderable dependen en gran medida del ingreso producido por la madera de cedro rojo y caoba (Pérez-Salicrup & Esquivel,

2008). Para aligerar la presión de la explotación maderera en los bosques naturales y para asegurar volúmenes aprovechables de madera en el futuro, el gobierno de México ha promovido sistemas agroforestales en los que *C. odorata* L. se ha establecido en áreas anteriormente usadas para la agricultura (SEMARNAT, 2005).

En las regiones del centro y sur del estado de Veracruz existen muchos agricultores interesados en plantar árboles de cedro rojo en los linderos de sus parcelas. En años recientes también ha aumentado el interés por establecer plantaciones comerciales de cedro rojo puras o en combinación con sistemas agroforestales en esta región (Murcia & Dorantes, 1996). En todos los casos, la plantación de *C. odorata* se considera como una inversión a largo plazo, puesto que el valor comercial de la madera de esta especie es superior que el de cualquier otra especie leñosa tropical, con excepción, quizás, de la caoba, *Swietenia macrophylla* (Patiño, 1997). Sin embargo, para asegurar el éxito comercial de estas plantaciones es necesario contar con germoplasma mejorado de poblaciones locales adaptadas a las condiciones ambientales de la zona (Sánchez *et al.*, 2003) y resistentes a *H. grandella* (Newton *et al.* 1993a).

2.2 Compuestos fitoquímicos: Metabolitos secundarios

Las plantas destinan una cantidad importante del carbono asimilado y de su energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas conocidos como metabolitos secundarios. Estos compuestos se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, por lo general su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies (Avalos & Pérez-Urria, 2009). Los metabolitos secundarios son de gran importancia ecológica porque participan en el proceso de adaptación de las plantas a su ambiente, como lo es el establecimiento de simbiosis con otros organismos y en la atracción de insectos polinizadores y dispersores de la semillas y frutos; además una síntesis activa de metabolitos secundarios se induce cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas tales como: a) consumo de herbívoros (artrópodos y vertebrados), b) ataque por microorganismos: virus, bacterias y hongos, c) competencia por el

espacio de suelo, luz y nutrientes entre diferentes especies de plantas, y d) la exposición solar u otro tipo de estrés abiótico (Sepúlveda *et al.*, 2003) (figura 7).

De esta manera, algunos metabolitos secundarios tienen funciones ecológicas específicas como atrayentes o repelentes de animales. Muchos son pigmentos que proporcionan color a flores y frutos, juegan un papel esencial en la reproducción atrayendo a insectos polinizadores, o atrayendo a animales que van a utilizar los frutos como fuente de alimento, contribuyendo de esta forma a la dispersión de semillas. Otros compuestos tienen función protectora frente a predadores, que actúan como repelentes, proporcionan a la planta sabores amargos, haciéndolas indigestas o venenosas. También intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes patógenos, al actuar como pesticidas naturales (Avalos & Pérez-Urria, 2009).

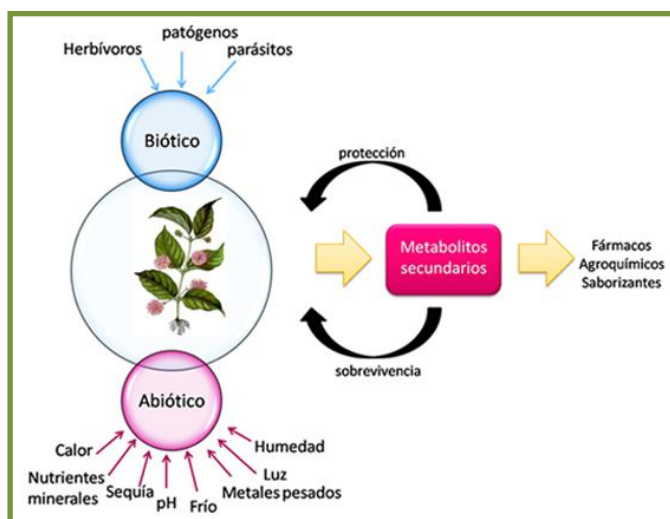


Figura 7. Eventos en los cuales los metabolitos secundarios se inducen durante la respuesta de defensa de las plantas.

La variedad estructural dentro de un mismo grupo de metabolitos secundarios está dada por las modificaciones químicas a una estructura básica originada por reacciones químicas, tales como la hidroxilación, epoxidación, metilación, malonización, esterificación y glucosilación. Esta variedad ocasiona perfiles metabólicos diferentes entre especies, entre los miembros de una población y entre

los diferentes órganos de la planta, la cual es parte de la estrategia de adaptación de las plantas (Sepúlveda *et al.*, 2003).

Es importante destacar que también reciben la denominación de productos naturales, estos tienen un importante valor medicinal y económico, derivado éste último de su uso en la industria cosmética, alimentaria, farmacéutica y agroquímica. Un gran número de estos productos naturales, que ya se usaban en la medicina antigua como remedios para combatir enfermedades, se utilizan en la actualidad como medicamentos, resinas, gomas, potenciadores de sabor, aromas, colorantes, etcétera (Avalos & Pérez-Urria, 2009).

Hasta la fecha, se han identificado más de 100.000 metabolitos secundarios en plantas (Dixon, 2001). Sin embargo, se considera que el potencial que ofrece el reino vegetal como fuente de compuestos potencialmente útiles no ha sido suficientemente aprovechado, ya que sólo un limitado porcentaje de las 270.000 especies de plantas superiores conocidas han sido investigadas en cuanto a sus compuestos activos y es frecuente el caso en que las plantas son investigadas solamente por un tipo específico de actividad biológica (Balandrin *et al.*, 1985).

Los metabolitos secundarios de las plantas se pueden clasificar en tres grupos principales, en base a sus orígenes biosintéticos y su composición química (Croteau *et al.*, 2000; Taiz *et al.*, 2006):

- 1) Compuestos fenólicos o fenoles
- 2) Terpenos o terpenoides
- 3) Compuestos que contienen nitrógeno o alcaloides

2.2.1 Compuestos fenólicos

Las plantas sintetizan una gran variedad de metabolitos secundarios que contienen el grupo fenol. Estos compuestos se conocen como compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides y derivan todas ellas del fenol, un anillo aromático con un grupo hidroxilo. Los compuestos fenólicos son los metabolitos secundarios más distribuidos, presentes de forma ubicua en el reino vegetal, se estima que alrededor del 2% de todo el carbono fotosintetizado por las plantas se convierte en flavonoides

o compuestos estrechamente relacionados (Lattanzio *et al.*, 2008). Por regla general, los términos fenoles y polifenoles deben referirse a metabolitos secundarios naturales, biogénicamente originados por la vía del ácido siquímico/fenilpropanoide o por la vía del policetido acetato/ácido malónico, y en ocasiones por ambas rutas, produciendo fenoles monoméricos, poliméricos y polifenoles (Markham, 1982; Lattanzio *et al.*, 2008).

Los polifenoles se encuentran en las plantas en forma conjugada con uno o más residuos de azúcar y un carbono, pueden producir uniones directas entre una molécula de azúcar y un carbono aromático. Los azúcares pueden ser monosácarido, disacáridos o incluso oligosacáridos, incluyendo glucosa, galactosa, arabinosa, ramnosa y xilosa. También pueden encontrarse unidos a ácidos carboxílicos, ácidos orgánicos, aminas, lípidos y a otros compuestos fenólicos (Harborne, 1989).

A menos que estén completamente esterificados, eterificados o glicosilados los compuestos fenólicos de las plantas son normalmente solubles en disolventes orgánicos polares. La mayoría de los fenoles glicosidados son solubles en agua pero las agliconas por lo general son menos. Con unas pocas excepciones, la solubilidad en agua aumenta con el número de grupos hidroxilo presentes. Algunos compuestos fenólicos se solubilizan en hidróxido de sodio y carbonato de sodio, pero en medios alcalinos aumenta su oxidación y por lo tanto el tratamiento con disolventes alcalinos debe ser evitado. Compuestos fenólicos con sólo unos pocos grupos hidroxilos son solubles en éter, cloroformo, acetato de etilo, metanol y etanol. Metanol, etanol, agua, y mezclas alcohol-agua son los más utilizados para disolver los compuestos fenólicos para efectos analíticos (Lattanzio *et al.*, 2008). Todos los compuestos fenólicos presentan intensa absorción en la región del espectro UV y los que son de color absorben también en la región visible. Cada clase de compuesto fenólico tiene características distintivas de absorción. Por ejemplo, fenoles y ácidos fenólicos muestran máximos presentan un rango espectral de 250-290 nm; derivados del ácido cinámico tienen máximos principales en el rango de 290-330 nm; flavonas y flavonoles tienen bandas de absorción de exposiciones de aproximadamente la misma intensidad en alrededor de 250 y 350 nm; chalconas y auronas tienen un pico

de absorción de gran intensidad por encima de 350 nm y un banda mucho menos intensa a 250 nm; antocianinas y betacianinas muestran absorción bastante similar en la región visible, 475-560 nm y 535-545 nm respectivamente y un pico subsidiario a aproximadamente 270-275 nm (Mabry *et al.*, 1970).

La estructura de los compuestos fenólicos y polifenoles vegetales varía a partir de moléculas simples, como los ácidos fenólicos, o a compuestos altamente polimerizados, como las proantocianidinas. Los compuestos fenólicos se clasifican de acuerdo al número de átomos de carbono de su esqueleto base: C_6 (fenoles simples, benzoquinonas), C_6-C_1 (ácidos fenólicos), C_6-C_2 (acetofenonas, ácidos fenilacéticos), C_6-C_3 (ácidos hidroxycinámicos, cumarinas, fenilpropenos, cromonas), C_6-C_4 (naftoquinonas), $C_6-C_1-C_6$ (xantonas), $C_6-C_2-C_6$ (estilbenos, antraquinonas), $C_6-C_3-C_6$ (flavonoides, isoflavonoides), $(C_6-C_1)_2$ (taninos hidrolizables), $(C_6-C_3)_2$ (lignanós, neolignanós), $(C_6-C_3-C_6)_2$ (biflavonoides), $(C_6-C_6)_n$ (ligninas), $(C_6)_n$ (melaninas, catecol), $(C_6-C_3-C_6)_n$ (taninos condensados) (Harborne, 1989; Lattanzio *et al.*, 2008). El grupo más numeroso son los flavonoides, se reportan que existen entre 4000 y 5000 flavonoides.

2.2.1.1 Flavonoides

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos ($C_6-C_3-C_6$), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6'12 (figura 8). Esta estructura básica permite una multitud de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C. En función de sus características estructurales se pueden clasificar en (figura 8):

1. Flavanos: como la catequina (figura 9), con un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
2. Flavonoles: representados por la quercitina (figura 9), que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C.

3. Flavonas: como la diosmetina (figura 9), que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.
4. Antocianidinas: que tienen unido el grupo -OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C (Martínez-Flores *et al.*, 2002).
5. Proantocianidinas, oligómeros y polímeros de unidades monoméricas flavan-3-ol, unidas generalmente por enlaces C-C (Martínez-Flores *et al.*, 2002).

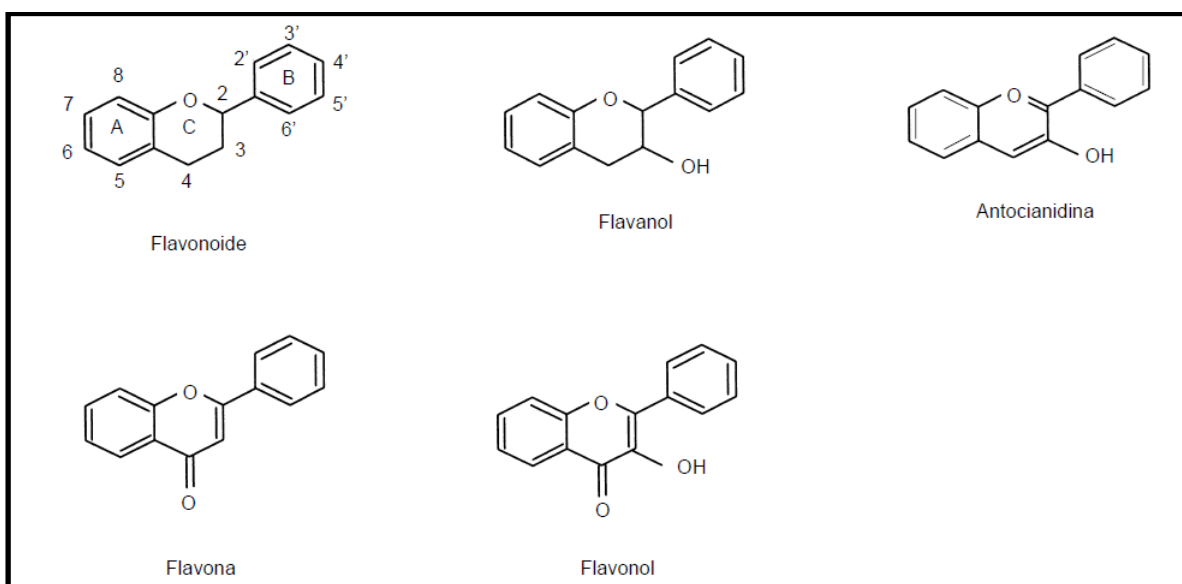


Figura 8. Flavonoides, estructura básica y tipos (Martínez-Flores *et al.*, 2002)

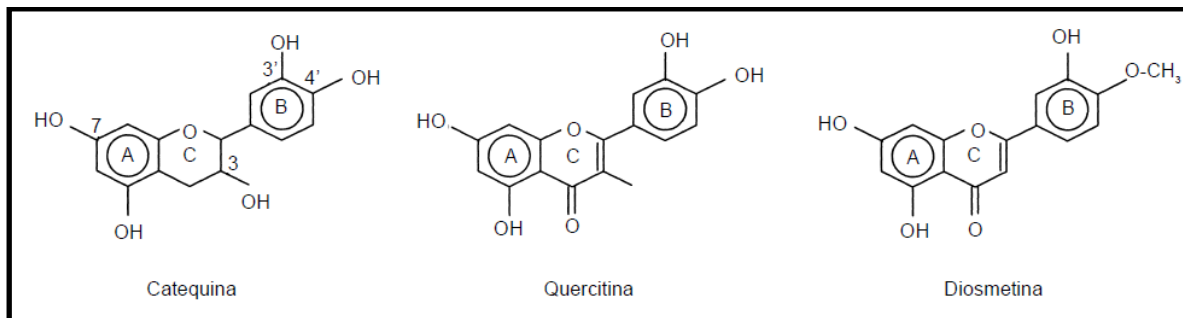


Figura 9. Características estructurales de los principales tipos de flavonoides (Martínez-Flores *et al.*, 2002).

2.2.1.2 Función de los compuestos fenólicos en la defensa de las plantas

Las plantas necesitan compuestos fenólicos para pigmentación, crecimiento, reproducción, resistencia a patógenos, y muchas otras funciones. Generalmente, el papel de los compuestos fenólicos en la defensa de las plantas se relaciona con propiedades antibióticas, antinutricionales o por su sabor desagradable. Además de su participación en las interacciones planta-animal y planta-microorganismo, los compuestos fenólicos de las plantas también tienen un papel clave como pigmentos rojo, azul, y púrpura, como antioxidantes y quelante de metales, como agentes de señalización entre el suelo-plantas y como pantallas de luz UV. Algunos estudios han mostrado que el metabolismo fenólico no es sólo un mecanismo de protección contra estrés biótico y abiótico, sino también parte de los programas moleculares que contribuyen al crecimiento y desarrollo normal de las plantas (Lattanzio *et al.*, 2008). De especial interés es la fototoxicidad de ciertas cumarinas, llamadas furanocumarinas, que tienen unido un anillo de furano. Estos compuestos no son tóxicos hasta que son activados por la luz, la luz del sol en la región ultravioleta A (UV-A) (320-400 nm) provoca en algunas furanocumarinas pasen al estado electrónico de mayor energía. Las furanocumarinas pueden introducirse al DNA y unirse a las pirimidínicas, citosina y timina, lo que bloquea la transcripción y reparación, y provoca muerte celular. Por otro lado, la liberación de compuestos fenólicos al suelo limita el crecimiento de las plantas vecinas, como es en el caso del ácido cafeico y el ácido ferulico (Avalos & Pérez-Urria, 2009).

Las plantas presentan numerosas plagas y agentes patógenos en el medio ambiente natural. Una apropiada respuesta a los ataques de esos organismos puede dar lugar a mecanismos de tolerancia o resistencia que permiten a la sobrevivir. Los mecanismos de resistencia se refieren a rasgos que inhiben o limitan el ataque, mientras que las estrategias de tolerancia no limitan el ataque pero reducen o compensan las consecuencias para que la planta mediante el ajuste de su fisiología pueda amortiguar los efectos de los herbívoros o las enfermedades. Estrategias de resistencia incluyen barreras físicas o químicas, mecanismos que rápidamente despejan la infección o alejan a los herbívoros (respuesta hipersensible), y los

procesos de tolerancia limitan la propagación del daño dentro del huésped. La tolerancia a menudo implica un cierto grado de compensación de los daños de la enfermedad. Las plantas pueden tolerar la infección o a los herbívoros por el aumento de la concentración de la clorofila en las hojas, el aumento del tamaño de las hojas nuevas o el número de nuevas ramas. La mayoría de las plantas producen una amplia gama de compuestos fenólicos que son tóxicos para los agentes patógenos y herbívoros, ya sea como parte de su programa normal de crecimiento y desarrollo o en respuesta al estrés biótico. Preformados compuestos antibióticos que se producen constitutivamente en plantas sanas es probable que representen barreras químicas incorporadas a los enemigos como herbívoros y hongos, puedan proteger a las plantas contra el ataque de una amplia gama de plagas y patógenos potenciales. En contraste, compuestos inducidos en la de defensa son sintetizadas en respuesta al estrés biótico como parte de la respuesta de la planta y están restringidos a los tejidos dañados (Lattanzio *et al.*, 2008).

2.2.2 Terpenos

Los terpenoides quizás son la clase más variada estructuralmente dentro de los metabolitos secundarios de plantas. El nombre de terpenoide, o terpeno, se deriva del hecho de que los primeros miembros de la clase eran aislados de trementina ("terpentin" en alemán) (Croteau *et al.*, 2000). La ruta biosintética de estos compuestos da lugar tanto a metabolitos primarios como secundarios de gran importancia para el crecimiento y supervivencia de las plantas. Entre los metabolitos primarios se encuentran hormonas, carotenoides, clorofilas, ubiquinonas y esteroides (Ávalos & Pérez-Urria, 2009). Todos los terpenoides tienen como precursor activado en su biosíntesis al isopentenil difosfato (IPP) compuesto de cinco carbonos. Todos los terpenoides son derivados por repetitiva fusión de unidades de cinco carbonos ramificados sobre la base de esqueleto del isopentano. Estos monómeros generalmente se conocen como unidades de isopreno porque la descomposición térmica de muchas sustancias terpenoides producen el gas isopreno como un producto y porque las condiciones químicas adecuadas puede inducir la

polimerización de isopreno en múltiplos de cinco carbonos, y así generar numerosos esqueletos terpenoides. Por estas razones, los terpenoides a menudo son llamados isoprenoides, aunque los investigadores han sabido por más de 100 años que el isopreno en sí no es el precursor biológico de esta familia de metabolitos (Croteau *et al.*, 2000).

Los terpenos se clasifican por el número de unidades de isopreno (5 átomos de C) que contienen: los terpenos más pequeños contienen una sola unidad de isopreno se denominan hemiterpenos (medios terpenos); los terpenos de 10 C contienen dos unidades C5 y se llaman monoterpenos; los de 15 C tienen tres unidades de isopreno y se denominan sesquiterpenos, y los de 20 C tienen cuatro unidades C5 y son los diterpenos. Los triterpenos tienen 30 C, los tetraterpenos tienen 40 C y se habla de politerpenos cuando contienen más de 8 unidades de isopreno (Ávalos & Pérez-Urria, 2009).

Los terpenos son toxinas y repelentes para un gran número de insectos y mamíferos que se alimentan de plantas, de forma que parecen que desempeñan un gran papel defensivo en el reino vegetal. Las plantas emiten una mezcla de compuestos orgánicos volátiles, los cuales ayudan a los enemigos naturales a ubicar a su presa u hospedero. Esta mezcla incluye a los terpenos (monoterpenos y sesquiterpenos). La emisión de estos compuestos volátiles aumenta drásticamente cuando los herbívoros, particularmente los de hábito alimenticio masticador, se alimentan de las plantas. Por lo tanto, estos compuestos inducidos por la herbívora han sido considerados como una forma de defensa indirecta en las plantas para combatir a los herbívoros mediante la atracción de sus enemigos naturales. Se ha determinado que esta respuesta volátil inducida puede ser específica, dependiendo de la especie de herbívoros en las plantas, puede ocurrir tanto a nivel local como en forma sistémica, ser de larga duración, y ocurrir tanto en las partes aéreas como subterráneas de las plantas. Los terpenos son producidos *de novo* en plantas dañadas por los herbívoros y por lo tanto, es considerada una respuesta específica a este tipo de daño (Pare & Tumlinson, 1997; Pare *et al.*, 1999)

Los monoterpenos son conocidos como componentes volátiles de las esencias de las flores y de aceites esenciales de hierbas y especias, los cuales representan el

5% del peso seco de la planta. Los monoterpenos son aislados por destilación o extracción, y se encuentran de manera considerable en la industria de perfumes y saborizantes. Al igual que los monoterpenos, muchos sesquiterpenos se encuentran en aceites esenciales. Además, numerosos sesquiterpenoides actúan como fitoalexinas, compuestos antibióticos producidos por las plantas en respuesta a microorganismos patógenos, y como antialimentarios que desalientan a los herbívoros (Croteau *et al.*, 2000). De esta manera, la resina de ciertas coníferas contiene monoterpenos que actúan como insecticidas, como es el caso de los metabolitos pineno y piretrina (figura 10). Entre los triterpenos se encuentran esteroides y esterol derivados del escualeno, una molécula de cadena lineal de 30 C de la que derivan todos los triterpenos cíclicos. Los esteroides que contienen un grupo alcohol, y es el caso de casi todos los esteroides vegetales, se denominan esterol. La principal función de los esterol en plantas es formar parte de las membranas y determinar su viscosidad y su estabilidad. Algunos esterol tienen funciones protectoras frente a insectos como en el caso de la ecdisona aislada del helecho común (Ávalos & Pérez-Urria, 2009).

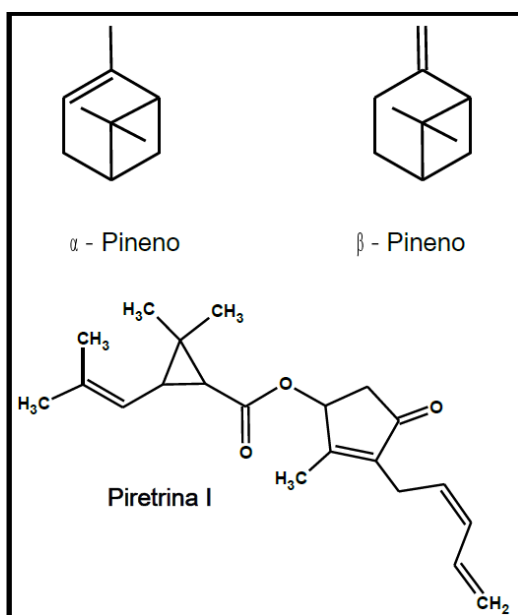


Figura 10. Estructura química de monoterpenos

2.2.2.1 Limonoides

Los limonoides (terpenos no volátiles) son triterpenos altamente oxigenados, clasificados como tetranortriterpenoides, y cuando son encontrados en plantas de la familia *Meliaceae* se conocen como meliacinas (figura 11). Limonoides son de polaridades moderadas, insolubles en agua pero solubles en hidrocarburos, el alcohol y cetona; en su mayoría son de sabor amargo y representan la esencia de cáscaras frescas de los cítricos. El término limonoide se deriva de limonina, el primer tetranortriterpenoide obtenido de cítricos amargos. Los limonoides han atraído recientemente atención debido a compuestos que pertenecen a este grupo han exhibido una gama de propiedades biológicas como insecticidas, antialimentarios en insectos y actividad reguladora del crecimiento de insectos, así como actividades antibacterianas, antifúngicas, antimalaria, contra el cáncer, antiviral y un número de otras actividades farmacológicas en humanos. Hasta la fecha, se han encontrado aproximadamente 300 limonoides, de los cuales un tercio pertenecen únicamente a las especies *Azadirachta indica* y *Melia azedarach*, ambas de la familia *Meliaceae* (Roy & Saraf, 2006).

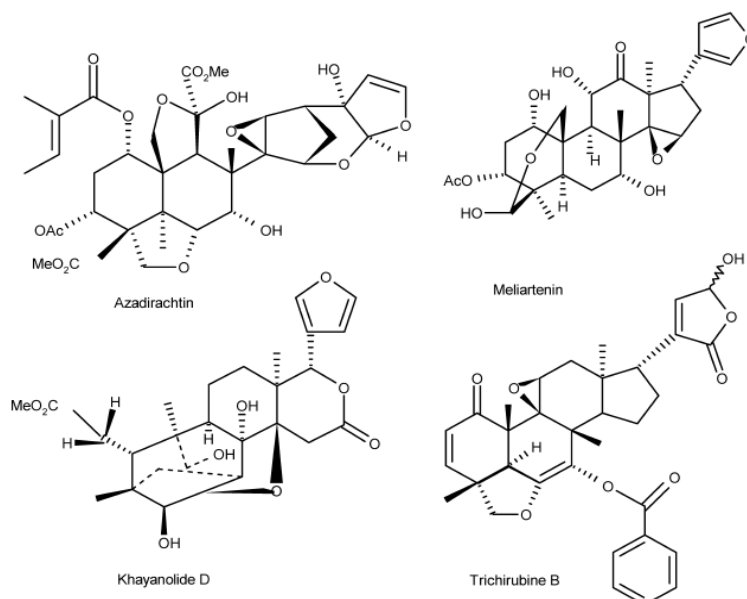


Figura 11. Estructura de algunos limonoides en meliáceas (Roy & Saraf, 2006).

Los limonoides de las meliáceas tienen gran potencial para controlar eficazmente una variedad de plagas de insectos sin dañar el ambiente. La azadiractina es un limonoide considerado dentro de los más poderosos repelentes de insectos que se usa en la agronomía para el control de plagas, el cual está presente en el árbol de neem (*Azadirachita indica*) en África y Asia (Ávalos & Pérez-Urria, 2009). Al menos nueve limonoides del árbol de neem han demostrado su capacidad para bloquear el crecimiento de insectos que afectan a una amplia gama de especies que incluyen algunas de las plagas más mortíferas de la agricultura y la salud humana; nuevos limonoides todavía se están descubriendo en el neem pero azadiractina, salannina, meliantriolo y nimbina son los más conocidos e importantes. La mayoría de la investigación que se ha hecho en el neem se ha centrado intensamente en azadiractina debido que es el ingrediente activo principal de un insecticida único, se cree que es tan peculiar debido a su modo de acción: no mata a los insectos inmediatamente como la mayoría de los pesticidas hacen, en cambio, cuando un insecto come azadiractina, ataca activamente el ciclo reproductivo del insecto, su patrón de alimentación, su desarrollo corporal y actúa como una toxina directa. Así, cuando azadiractina es rociado en la planta y el insecto toma un bocado, el insecto ya no será capaz de reproducirse, comer, o crecer. Debido a que este compuesto único sólo afecta a los insectos que la consumen, otros insectos "amigables", que ayudan a la polinización y otras funciones de la planta, no se vean perjudicados; se trata de un "plaguicida de espectro reducido". Las pruebas han demostrado que azadiractina es eficaz por lo menos en 200 diferentes especies diferentes. Azadiractina y limonoides relacionados han mostrado un fuerte actividad antialimentaria y al mismo tiempo estos compuestos son altamente biodegradables, son ligeramente tóxicos para los organismos no diana, mientras que no son tóxicos en los seres humanos y los mamíferos en general; esta es la razón por la que una gran variedad de insecticidas y pesticidas presentes en el mercado tienen a la azadiractina como componente principal (Roy & Saraf, 2006).

2.2.3 Metabolitos secundarios en *C. odorata*

Los metabolitos secundarios de aceites y extractos de *C. odorata* han sido ampliamente estudiados con diferente finalidad, entre ellas, la búsqueda de nuevos limonoides antialimentarios, las implicación ecológica en la atracción de *H. grandella*, evaluación de las propiedades inhibitorias de crecimiento frente algunos insectos y la investigación de sus propiedades medicinales (De Paula *et al.*, 1997; Asekun & Ekundayo, 1999; Da Silva *et al.*, 1999; Martins *et al.*, 2003; Omar *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2007; Kipassa *et al.*, 2008; González-Coloma *et al.*, 2012). En este sentido, en el aceite de tallos de *C. odorata* se ha encontrado la presencia de sesquiterpenos como β -cariofileno y oxido de cariofileno, mientras que en el aceite de hojas se destaca la presencia de los sesquiterpenos β -elemeno y A-germacreno, investigaciones de estos aceites esenciales sugieren que las hembras usan mensajes olorosos de la planta hospedante como un comportamiento de búsqueda estratégica para la localización del hábitat y la ovoposición (Maia *et al.*, 2000).

Por otro lado, Villanueva *et al.*, (2009) analizó aceite volátil de la corteza de *C. odorata* de Monteverde, Costa Rica, donde encontraron principalmente sesquiterpenos hidrocarbonados y sesquiterpenos oxigenados, donde destacan en mayor proporción los sesquiterpenos hidrocarbonados: β -elemeno (20,3%), D-germacreno (15,4%) y β -acoradieno (7,0%), junto con el sesquiterpeno alcohol 1,10-diepi-cubenol (7,2%). Este aceite esencial presentó actividad antimicrobiana frente a la bacteria Gram-positiva *Bacillus cereus* y el hongo *Aspergillus niger*.

Además, una fuente importante de limonoides en la familia meliácea es el género *Cedrela*. De esta manera, en *C. odorata* se han aislado limonoides como la gedunina que presenta una actividad antimalaria contra *Plasmodium falciperum* (Roy & Saraf, 2006; Saxena *et al.*, 2003). Asimismo, el limonoide cedrelona presente en *C. odorata*, ha sido evaluado como un inhibidor de crecimiento en larvas polífagas de *Peridroma saucia* y *Mamestra configurata* (Koul & Isman, 1992).

Por otro lado, estudios en extractos metanólicos de la corteza desgrasada del tallo de *C. odorata*, los cuales fueron particionados con éter, acetona y metanol, estas particiones se analizaron mediante métodos cromatográficos (HPLC) y

espectroscópicos (NMR, HRFAB-MS, IR) donde se identificaron varios limonoides: 4 derivados de nomilina/Obacunol y un nuevo dihidroswitenolide, junto con 7 limonoides ya conocidos. La actividad antialimentaria de estos compuestos se probó contra larvas de *Spodoptera littoralis* por el método convencional disco de hoja. Los derivados de nomilina / Obacunol fueron débilmente activos en 1000 ppm y los mexicanolides mostraron actividades moderadas a la misma concentración, siendo el más potente nuevo dihidroswitenolide llamado 8 β ,14 α -dihidroswietenolide, el cual fue activo a 500 ppm (Kipassa *et al.*, 2008).

La investigación sobre la base bioquímica de la resistencia a la *H. grandella* en la familia Meliaceae se ha centrado en el estudio de diversos compuestos fitoquímicos. De Paula *et al.*, (1997) llevaron a cabo un estudio fitoquímico de *C. odorata* injertada en *Toona cilata* (Meliaceae), especie que crece a lo largo de Asia del sur, desde Afganistán a Papúa Nueva Guinea y Australia, introducida en Brasil que presenta excelente crecimiento y ausencia de ataque por *H. grandella*; estos autores especulan que cicloartanos, catequinas y proantocianidinas son probablemente los responsables de esta resistencia, ya que todos ellos estaban ausentes en *C. odorata* intacta (no injertadas) pero presente en *T. ciliata*. En este estudio los limonoides fueron de poco valor para aclarar la base de la resistencia inducida en el injerto *C. odorata*-*T. cilata* contra *H. grandella*. De igual forma, Newton *et al.* (1999) sugiere que las proantocianidinas pueden reducir la susceptibilidad de *C. odorata* al ataque de larvas de *H. grandella*.

Además, otros compuestos fenólicos, como metilcumarinas y furanocoumarinas como el bergapteno, se han encontrado en *T. ciliata* (Chowdhury, 2004), y los flavonoides como quercitina y Kaempferol en *C. odorata* y *T. ciliata* (Chatterjee *et al.*, 1971). Las furanocoumarinas son potentes factores de disuasión para la alimentación de ciertas especies de insectos (Schoonhoven, 1982), y el bergapteno podría promover la resistencia de *T. ciliata* contra larvas de *H. grandella*.

Otros compuestos fitoquímicos, encontrados en las especies de Meliaceae que podrían proporcionar la resistencia contra *H. grandella* son los alcaloides. Los alcaloides son compuestos de nitrógeno que funcionan como defensas de las plantas contra los herbívoros (Caporale, 1995) y se han detectado en extractos etanólicos de

T. ciliata (Smolenski et al., 1974). Estos extractos tuvieron efectos tóxicos y redujeron el crecimiento de larvas de *H. grandella* (Grijpma & Roberts, 1975). Por lo tanto, los compuestos alcaloides podrían ser responsables de la resistencia de *T. ciliata* contra larvas de *H. grandella* (Grijpma, 1976).

2.3 Marcadores moleculares en el estudio de la variación genética

Existen dos clases de marcadores genéticos: los morfológicos y los moleculares. En primer orden, la caracterización e identificación tradicional de variedades se ha basado en el empleo de caracteres morfológicos y/o agronómicos. No obstante, el uso de marcadores morfológicos en las plantas tiene muchas limitantes, pues su expresión puede estar sujeta a factores ambientales o fenológicos. Con frecuencia estos marcadores solo es posible evaluarlos a nivel de toda la planta y cuando esta llega a su estado adulto. Para una gran mayoría de especies vegetales esto significa una espera, no deseable, de varios años. Además, pueden ocurrir cambios epigenéticos que limitan el número de marcadores que pueden ser evaluados sin equivocación en la población segregante (Powell 1992; Phillips et al. 1995). Por otro lado, gracias a los avances en la biología molecular se han desarrollado métodos de identificación y caracterización basados en el uso de marcadores moleculares que superan, en la gran mayoría de los casos, las limitaciones de los métodos tradicionales (Azofeifa-Delgado, 2006).

Un marcador molecular es un fragmento (secuencia) de ADN que por sí solo, o combinado en alineación con otros, puede ser físicamente localizado dentro del genoma de un organismo. Tales fragmentos pueden encontrarse cerca a un gen que codifica una característica de interés o en regiones que sin ser codificantes, contienen características estructurales particulares. Una de las características de los marcadores moleculares es que son específicos para cada individuo, grupo de individuos, especies o aún de grupos sistemáticos mayores, lo cual los convierte en herramientas útiles para el análisis tanto de individuos como de poblaciones (Karp & Edwards, 1997). Un buen marcador debe reunir ciertas características, para maximizar su utilidad, entre ellas, debe de tener una buena distribución a lo largo de

todo el genoma y un alto grado de polimorfismo. La técnica para analizar un marcador debe ser rápida, práctica y debe repetirse con facilidad (Cheng & Crittenden, 1994).

Hoy en día se cuenta con un gran número de marcadores moleculares, los cuales han sido usados con varios fines. Los usos más frecuentes corresponden a la estimación de la diversidad genética intra e inter poblacional, sea en especies cultivadas o silvestres, desarrollo de mapas de ligamiento, para estudio de las relaciones filogenéticas entre especies, también como herramienta para determinar la mejor estrategia de conservación de recursos genéticos por ejemplo en la formación de colecciones nucleares, en la identificación de duplicados, caracterización de germoplasma, identificación de genotipos, aislamiento y caracterización de genes específicos para usar en transformación genética y mejoramiento genético asistido por marcadores (Azofeifa-Delgado, 2006).

La diversidad entre organismos es consecuencia de las diferencias en las secuencias de ADN y de los efectos ambientales. La variación genética es notable, y cada individuo de una especie, a excepción de los gemelos monocigóticos, posee una secuencia de ADN única. Las variaciones en el ADN son mutaciones resultantes de la sustitución de un solo nucleótido (polimorfismos de un solo nucleótido-SNP), inserción o delación de fragmentos de ADN de diversas longitudes (desde uno a varios miles de nucleótidos), o duplicación o inversión de fragmentos de ADN. Las variaciones del ADN se clasifican como neutras cuando no originan cambios en los caracteres metabólicos o fenotípicos, y por consiguiente no están sometidas a selección positiva, negativa o de reequilibrio; en caso contrario, se denominan funcionales. La información sobre la diversidad genética es esencial para optimizar estrategias en programas de conservación.

Genética de poblaciones pueden entenderse como el estudio de las diferencias genéticas presentadas naturalmente entre organismos, estas diferencias se conocen como variación genética. La variación genética puede ocurrir en tres niveles jerárquicos: a) dentro de las poblaciones, b) entre las poblaciones de la misma especie, y c) entre diferentes especies (Conner y Hartl 2004). Del mismo modo, Lowe et al. (2004) separa la variación genética en tres componentes: a) la

diversidad genética (la cantidad de variación genética); b) diferenciación genética (la distribución de la variación genética entre las poblaciones); y c) la distancia genética (la cantidad de la variación genética entre pares de poblaciones).

Entendida como la variación hereditaria de los genes dentro de los organismos biológicos, la diversidad genética se puede medir a nivel individual, poblacional, y a nivel de especies (Lowe et al., 2004). A nivel individual, la diversidad genética se define por las frecuencias relativas de los alelos, también conocido como riqueza de alelos (A), que son las diferentes expresiones del mismo gen (locus), que se heredan del padre y la madre. La diversidad alélica es el número medio de alelos por locus, y puede ser calculado por población o por especie. La diversidad genética se describe con el uso de polimorfismo y la heterocigosidad promedio. La proporción de loci polimórfico (P) se calcula dividiendo el número de loci polimórficos entre el número total de loci presentes. Considerando que la heterocigosidad promedio (H) es la suma de las proporciones de heterocigotos en todos los loci, dividido entre el número total de loci en las muestras. En el caso de poblaciones, la diversidad genética se define por el tipo de alelos presentes, y las frecuencias relativas, y se expresa en nivel de población o entre diferentes poblaciones (Nason, 2002, Frankham *et al.*, 2004). El número medio de alelos (MNA) por población, y la heterocigosidad observada y esperada (H_o y H_e), son los parámetros más usuales en la evaluación de la diversidad intrapoblacional. Los parámetros más simples para evaluar la diversidad interpoblacional son los índices de diferenciación genética o de fijación. Se han propuesto varios estimadores (F_{ST} y G_{ST}), de los cuales el más ampliamente utilizado es el F_{ST} , que miden el grado de diferenciación genética de las subpoblaciones calculando las varianzas estandarizadas de frecuencias alélica entre poblaciones. Se puede calcular la significación estadística para los valores de F_{ST} entre pares de poblaciones para comprobar la hipótesis nula de una falta de diferenciación genética entre poblaciones, y por tanto, la división de la diversidad genética. Puede realizarse un análisis jerárquico de la varianza molecular (AMOVA) para evaluar la distribución de diversidad dentro y entre grupos de poblaciones.

La diversidad genética conserva una reserva de las condiciones de respuesta al cambio medio ambiente, lo que permite la adaptación y la supervivencia. Las

especies mantienen la variación genética como un producto de la supervivencia. Por lo tanto, la conservación de la diversidad genética es una condición previa necesaria para la evolución futura y la adaptación de poblaciones y especies enteras, y es un elemento clave en el mantenimiento de todos los niveles de biodiversidad (Boyle *et al.*, 2002). La pérdida de variación genética amenaza la capacidad de las especies y ecosistemas ha adaptarse a entornos cambiantes. En general, la pérdida de la variación genética es difícil de medir directamente, y su efecto sobre la dinámica de las poblaciones y de los ecosistemas es a menudo muy difícil de entender, en consecuencia, su pérdida se ignora fácilmente hasta que es demasiado tarde para recuperar o restaurar (Boyle *et al.* 2002).

Más drásticamente, la erosión genética induce la extinción de especies y la pérdida de ecosistemas, descartando la posibilidad de utilizar la variación genética para obtener beneficios económicos y la restauración ecológica. Comúnmente, las presiones sociales y económicas sobre los bosques prevalecen sobre las necesidades ecológicas, que tiene una influencia directa sobre la diversidad genética en todos sus niveles. El práctica de manejo forestal, incendios, pastoreo y efectos secundarios no deseados del cambio climático pueden dar lugar a reducciones de la variación genética, debido a cambios en los procesos evolutivos básicos tales como la selección, la deriva, migración y apareamiento (Boyle *et al.* 2002).

2.3.1 Diversidad genética en cultivos

Las amenazas globales a la biodiversidad no deberían ser ajenas a los estudiosos de la agricultura, ya que ésta, que cubre cerca del 25-30% de los suelos del mundo, es tal vez una de las principales actividades que afecta a la biodiversidad. La pérdida de biodiversidad tendrá un gran impacto en la capacidad de la humanidad para alimentarse en el futuro, los 9 000 millones de personas que seremos en 2050, con los más pobres del mundo entre los más afectados. El cambio climático y la creciente inseguridad alimentaría son grandes desafíos para los sistemas agrícolas del mundo, desafíos que no pueden afrontarse sin la recolección, preservación y uso sostenible de los recursos fitogenéticos (FAO, 2010).

La información genética que albergan determinados cultivos es crucial para el desarrollo de nuevas variedades de crecimiento rápido, elevado rendimiento y resistentes al calor, la sequía, salinidad y las plagas.

Por lo anterior, el conocimiento del nivel y distribución de la variabilidad genética dentro de un cultivo es de gran valor para el mantenimiento de la biodiversidad. Además, la noción de la variabilidad genética de un agrosistema presenta diversas aplicaciones, incluyendo la caracterización molecular de variedades, cultivares e individuos (Mohammadi *et al.*, 2003).

La diversidad genética proporciona un mayor potencial para el mejoramiento genético de cultivos (Tanksley *et al.*, 1997). De esta manera, el análisis de las relaciones genéticas de especies cultivadas es un importante componente en los programas de mejoramiento genético de cultivos. Una medición precisa de los niveles y patrones de diversidad genética es invaluable en la mejora de cultivos por diversas aplicaciones, entre ellas: el análisis de la variabilidad genética en cultivares, identificar diversas combinaciones parentales para crear progenies segregantes con la máxima variabilidad genética para selección posterior e introgresión de genes de interés de germoplasma diverso en la base genética disponible. El conocimiento de las relaciones genéticas entre líneas puras puede ser particularmente útil en cruza, en asignar líneas a grupos heteróticos específicos y para la identificación precisa en relación a la protección de las variedades vegetales. El análisis de la variabilidad genética en colecciones de germoplasma puede facilitar la clasificación confiable de accesiones con posible utilidad para propósitos de mejoramiento genético específicos (Mohammadi *et al.*, 2003).

La diversidad genética de los cultivos puede ser analizada en diferentes niveles: genotipos individuales como líneas puras o clones, poblaciones, accesiones de germoplasma y especies. La estrategia de muestreo en cada uno de los casos podría variar, principalmente por la diferencia en la naturaleza de los materiales genéticos. En contraste, en líneas puras la estrategia de muestreo para el análisis de la diversidad genética a nivel poblacional es complicado por varios factores, incluyendo el ligamiento, endogamia, migración y diferenciación subpoblacional (Mohammadi *et al.*, 2003).

Por consiguiente, se ha documentado que la abundancia del polimorfismo en los microsatélites, se debe al sistema de mutación, que es el apareamiento erróneo durante la replicación (*slippage mispairing*), lo cual explica también el hecho de que las secuencias que flanquean a los microsatélites sean tan conservadas, ya que este mecanismo de mutación no causa cambios en las secuencias flanqueantes, al contrario que otros mecanismos de mutación como es la recombinación desigual (*unequal crossing-over*). De esta manera, el que las secuencias flanqueantes sean tan conservadas es lo que permite amplificar mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) las secuencias de microsatélites.

Además, los SSR representan un nivel adicional de información genómica que se puede usar para los estudios de mapeo y para la determinación de polimorfismos (Phillips et al. 1995). El desarrollo de marcadores SSR es muy laborioso debido a que deben identificarse y secuenciarse regiones genómicas concretas (bordes del microsatélite), aunque una vez conseguido presenta un sistema muy informativo. Los microsatélites permiten analizar sólo un locus por experimento y son bastante informativos ya que dejan diferenciar las variantes alélicas de los loci analizados y por lo tanto identificar grupos de ligamiento entre diferentes mapas genéticos. Sin embargo, para su desarrollo se precisa conocer la secuencia y, por lo tanto, son menos numerosos que otros marcadores dominantes (Azofeifa-Delgado 2006). Estos marcadores se usan en el estudio de ligamiento genético en plantas y el mapeo físico, los estudios poblacionales y la identificación de variedades.

En la actualidad los SSR han sido automatizados, técnica conocida como análisis de fragmentos automatizado, donde se utilizan secuenciadores automáticos, basados en electroforesis capilar, y los microsatélites son marcados con fluoróforos, lo que permite la precisión en el tamaño de los alelos amplificados en PCR. Este aspecto es particularmente importante en el análisis poblacional de plantas para minimizar errores de genotipificación (Missiaggia et al. 2006). Una de las principales ventajas de esta metodología es la detección multicolor, Se pueden utilizar hasta 5 marcadores fluorescentes simultáneamente (uno de ellos reservado para el marcador de tamaños moleculares) y combinar diferentes tamaños alélicos en la misma

muestra por lo que por cada capilar en una misma electroforesis se pueden analizar multitud de fragmentos.

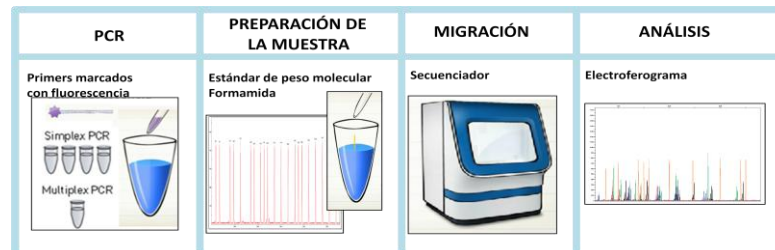


Figura 13. Diagrama del Análisis de fragmentos automatizado.

2.3.3 Estudios moleculares en *C. odorata*

Gillies *et al.*, (1997), llevaron a cabo uno de los primeros estudios moleculares reportados en *C. odorata* L., el cual consistió en determinar variabilidad genética de 10 poblaciones de Costa Rica mediante el uso de los marcadores moleculares RAPDs, los resultados indicaron diferencia genética significativa entre poblaciones del Pacífico Norte y del Pacífico Sur de Costa Rica. Posteriormente, Cavers *et al.*, (2003) utilizó los marcadores moleculares AFLP para determinar la variabilidad genética de *C. odorata* L. de poblaciones de Costa Rica, estos resultados se compararon con los obtenidos por Gillies *et al.*, (1997), la comparación de ambos resultados sugieren unidades evolutivamente significativas en esta especie. Por otro lado, se ha reportado una fuerte diversidad genética entre poblaciones de Costa Rica, Panamá, sur de México y Honduras utilizando los marcadores moleculares RAPDs (Navarro *et al.*, 2005).

Cavers *et al.*, realizaron un estudio filogeográfico en *C. odorata* en Mesoamérica por medio de ADN de cloroplasto con muestras de 29 poblaciones de México, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Costa Rica y Panamá. Se caracterizaron cinco haplotipos que fueron filogenéticamente agrupados en tres linajes: norte, centro y sur. Los linajes Norte y Centro fueron los más distantes genéticamente entre sí (nueve mutaciones), seguido por los linajes Norte y Sur con seis mutaciones, y el centro y sur con tres mutaciones. Este patrón probablemente refleja antiguos

procesos de colonización que han ocurrido durante miles de millones de años, donde el linaje centroamericano está genéticamente más relacionado con las poblaciones del sur más diferenciado de las poblaciones del norte.

Hernández *et al.*, (2007) lograron aislar y caracterizar marcadores microsatélites para *C. odorata* L., donde se obtuvieron nueve oligonucleótidos para la amplificación de este tipo de secuencias. Los loci fueron optimizados mediante PCR usando 487 individuos en 68 familias de 12 poblaciones distribuidas en Mesoamérica. Los niveles de polimorfismo se determinaron utilizando muestras en un ensayo de progenie. A través de loci, el número de alelos osciló entre 14 y 30. La heterocigosidad observada fue de 0.61 a 0.88. No se detectó desequilibrio de ligamiento aunque se detectaron algunas desviaciones en el Equilibrio Hardy-Weinberg (HWE), probablemente debido a un efecto Wahlund.

De manera similar, De la Torre *et al.*, (2008) estudiaron la diversidad genética de nueve poblaciones de la Amazonía Peruana con la finalidad de determinar los niveles de diversidad genética con base en marcadores AFLP. El análisis de varianza molecular indicó diferencias significativas entre las jerarquías analizadas (entre grupos de poblaciones; entre poblaciones y dentro de poblaciones) además de la asociación entre las distancias geográficas y las distancias genéticas entre ecotipos.

3 JUSTIFICACIÓN

C. odorata es una especie maderable preciosa que ha sido severamente afectada por la deforestación. El factor limitante más importante para el establecimiento exitoso de plantaciones de esta especie es el ataque de *Hypsipyla grandella*, el cual se relaciona con compuestos fitoquímicos producidos por *C. odorata*. Además, se encuentra en tratados internacionales como el Apéndice III del CITES y de la lista roja de la Norma Oficial Mexicana NOM- 059- SEMARNAT- 2010 como especie sujeta a protección especial. En este sentido, en nuestro país existen programas destinados a realizar acciones para la conservación y mejoramiento genético de la especie, para lo cual el conocimiento de la variabilidad genética es uno de los pasos más importantes cuando se trata de ensamblar una población base para futuras generaciones de selección y mejoramiento genético. El conocimiento de la variabilidad genética y fitoquímica de *C. odorata* cultivada en una plantación experimental de diferentes procedencias del sureste de nuestro país permitirá contribuir con información importante para la selección de individuos con potencial genético para la conservación y mejoramiento.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Determinar la variabilidad molecular (microsatélites) y fitoquímica (fenoles y limonoides) de *C. odorata* L. cultivada mediante reproducción por injerto a partir de individuos de diferentes procedencias, para la selección de genotipos con potencial genético para la conservación y mejoramiento.

4.2 Objetivos específicos

1. Determinar la variabilidad en la concentración de fenoles totales, flavonoides, proantocianidinas y limonoides.
2. Evaluar los perfiles cromatográficos de extractos fenólicos y terpénicos entre individuos de las diferentes procedencias.
3. Determinar la variabilidad molecular utilizando marcadores microsatélites.
4. Asociar el estudio fitoquímico, con la base de datos del crecimiento maderable y el ataque del barrenador, registrados en la plantación.
5. Dar seguimiento a árboles establecidos en plantaciones de diferentes localidades, para la selección de individuos para su conservación y mejoramiento.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

El diagrama de flujo del proceso experimental de la primera etapa de esta investigación se presenta a continuación (figura 14):

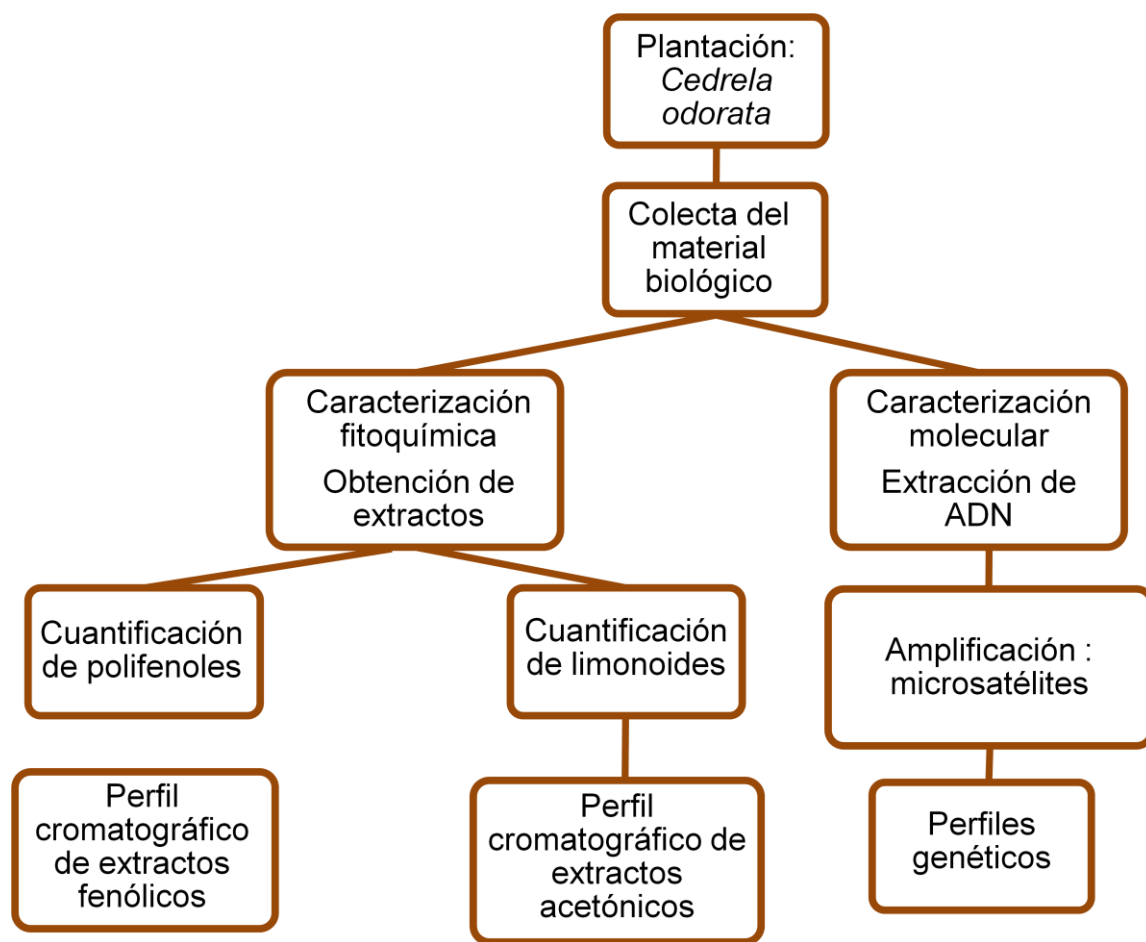


Figura 14. Diagrama de flujo general de caracterización fitoquímica y molecular.

5.1 Sitio de estudio

El estudio se llevó a cabo en una plantación de un año de edad. Los árboles fueron propagados por injerto y plantados en el Campo Experimental “El Palmar” (18°31'2"04" N 96°47'55"99" W, altitud 180msnm) del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (INIFAP), en Tezonapa, Veracruz, México. El clima del sitio es cálido-húmedo con lluvias en verano con una precipitación media anual de 2888mm, y temperaturas medias de 16 a 36°C en el año. La fisiografía presenta terrenos planos y lomeríos, los suelos son del tipo acrisol, profundos y de buen drenaje y poseen una textura migajón-arcillo-arenoso y pH de 4.8 (Sánchez *et al.*, 2003).

5.2 Colecta de material biológico

Caracterización fitoquímica: Se colectaron hojas de 66 individuos de *C. odorata* procedentes de siete localidades: Papantla, Veracruz; Tuxtepec, Oaxaca; Teapa, Tabasco; Los Tuxtlas, Veracruz; Cárdenas, Tabasco; Calakmul, Campeche y una de la frontera México-Guatemala. El muestreo se realizó en octubre de 2012, se recolectaron aproximadamente 300g de hojas frescas en árboles de la misma edad, se seleccionaron hojas de tamaño uniforme con la misma apariencia y color al tiempo de la recolecta. Las hojas se secaron a temperatura ambiente a la sombra, se molieron por separado en un molino Willey hasta un tamaño de partícula de malla 60 y se almacenaron en bolsas de plástico con cierre hermético hasta su uso (Rosales-Castro *et al.*, 2009).

Caracterización molecular: Se colectaron hojas de 93 individuos de *C. odorata*, procedentes de 15 localidades y 10 individuos de procedencia desconocida. Se seleccionaron folíolos y yemas, las muestras fueron envueltas en papel aluminio y colocadas en bolsas de plástico con cierre hermético que contenían silica, las muestras fueron trasladadas inmediatamente al laboratorio y colocadas en un desecador hasta su uso.

5.3 Caracterización fitoquímica

5.3.1 Obtención de extractos

Se realizaron dos tipos de extracciones, extractos metanólicos para la evaluación de fenoles, y extractos acetónicos para evaluar limonoides, ya que de acuerdo a Harborne (1973) son los solventes indicados para estos compuestos.

Extractos metanólicos: A 20 g de hojas secas molidas se le adicionaron 50 ml de metanol acuoso al 70% (v/v), se dejaron macerar durante 48 horas en la oscuridad y se filtraron sobre papel filtro para recuperar el extracto, a la muestra remanente se le agregaron 25 ml de solvente fresco y se dejó macerar por 24 horas en la oscuridad, después se filtró y se desechó el residuo. Los extractos obtenidos de la primera y segunda maceración se combinaron y se concentraron en rotavapor a 45 °C para remover el solvente. Finalmente se dejó secar el extracto a temperatura ambiente en una campana de extracción para obtener el extracto metanólico crudo (EMC).

Extractos acetónicos: A 20 g hojas secas molidas se agregaron 100 ml de acetona al 99%, se dejaron macerar durante 24 horas, después de este tiempo se filtraron sobre papel filtro para recuperar el extracto, a la muestra remanente se le agregaron 50 ml de acetona y se maceraron durante 48 horas. Los extractos obtenidos de la primera y segunda maceración se combinaron y se concentraron en rotavapor a 45 °C para remover el solvente y obtener el extracto acetónico crudo (EAC).

5.3.2 Purificación de extractos

Al EMC se le realizó una purificación primaria mediante una separación líquido-líquido con acetato de etilo. A 20mL del extracto metanólico crudo concentrado (después de la evaporación del solvente), se le adicionaron 2x50mL de acetato de etilo en un embudo de separación, la mezcla se agitó vigorosamente y se

dejó en reposo para permitir la separación de las fases inmiscibles. La fracción de compuestos soluble en el acetato de etilo (fracción orgánica EMFO) se separó de la fracción insoluble, y se llevó a sequedad en rotavapor a 45°C.

El EAC se disolvió en 2mL de acetona y se colocó en una columna cromatográfica empacada con gel de sílice suspendido en diclorometano. La muestra se eluyó con diclorometano y se obtuvo la fracción uno del extracto acetónico (EAF1).

5.3.3 Evaluación de compuestos fenólicos

Determinación de fenoles totales: La determinación de fenoles totales se realizó con el método de Folin-Ciocalteu descrito por Waterman y Mole (1994). El método, brevemente, consiste en la adición de 0.1ml de muestra diluida de extracto, 6ml de agua desionizada y 0.5ml de reactivo de Folin-Ciocalteu. Posteriormente, después de 1min y antes de 8min, agregar 1.5ml de Na_2CO_3 (20% p/v). El volumen final se ajustó a 10ml con agua desionizada. La mezcla se dejó en reposo durante 2h en la oscuridad, y la absorbancia se midió a 760nm. Los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco (EAG/g e). Usando como estándar al ácido gálico. Las determinaciones se realizaron por cuadruplicado.

Determinación de flavonoides: El contenido de flavonoides se determinó mediante el método colorimétrico descrito por Dewanto *et al.* (2002) ligeramente modificado por Heimler *et al.*, (2005), descrito a continuación: a 0.25ml de muestra, se agrega una solución de 75µl de NaNO_2 al 5%, 0.150ml de una solución de AlCl_3 al 10% recién preparada y 0.5ml de NaOH al 1 M. El volumen final se ajusta a 2.5ml con agua desionizada. La mezcla se deja reposar durante 5 min, y se mide la absorbancia a 510nm contra. Los resultados se expresaron como equivalentes de catequina por gramo de extracto seco (EC/g e). Se uso catequina como estándar. Las determinaciones se hicieron por cuadruplicado.

Determinación de proantocianidinas: La determinación de proantocianidinas (taninos condensados) se realizó por el método propuesto de Heimler *et al.* (2005). El

método, brevemente, consiste en la adición de 50µl de muestra de extracto diluido, 3ml de solución de vainillina en metanol al 4% y 1.5ml de HCl concentrado. La mezcla se dejó en reposo durante 15min, y se midió la absorbancia a 500nm. La catequina fue utilizada como estándar. Los resultados se expresaron como equivalentes de catequina por gramo de extracto seco (EC/g e). Las determinaciones se realizaron por cuadruplicado.

5.3.4 Evaluación de limonoides

Los limonoides se determinaron siguiendo la metodología establecida por Dai *et al.* (1999), la cual se describe a continuación: A 700µl de extracto se le adicionan 200µl de una solución de vainillina (0.02mg ml⁻¹), se mezcla manualmente y se deja reposar a temperatura ambiente por 2min. Posteriormente se le agregan 300µl de H₂SO₄ al 98% y se agita por 10s, después se le agregan 700µl de metanol y se deja reposar a temperatura ambiente por 5min. Finalmente se mide la absorbancia a 577nm. Se realizó una curva de calibración con limonina y los resultados se expresaron como equivalentes de limonina por gramo de extracto seco (EL/g e). Las determinaciones se hicieron por cuadruplicado.

5.3.5 Evaluación cromatográfica

Perfil cromatográfico de extractos fenólicos: Para la obtención de los perfiles cromatográficos de fenoles se utilizó HPLC, en un cromatógrafo marca Perkin Elmer, serie 200 con detector UV de arreglo de diodos (UV-DAD), columna C₁₈, 5µm de poro, 4.6mm por 250mm. Los extractos EMFO se disolvieron en metanol grado HPLC y se inyectaron 20µL de muestra. Como sistema de elución se utilizó como fase A agua acidificada con ácido fosfórico a un pH de 2.9 y como fase B acetonitrilo, flujo de 1mL/min. La elución se inició con 100% de A y finalizó con 40% de B en un tiempo de 40min. Se midieron a longitudes de onda de 280 y 360nm. Como estándar de referencia se utilizó solución de catequina a 1000mg/L.

Perfil cromatográfico de extractos acetónicos: Para la evaluación cromatográfica de los extractos acetónicos, los extractos EAF1 y EAC fueron analizados mediante CG-MS, en un cromatógrafo marca Hewlett-Packard (Agilent) serie HP-5890 con un detector de ionización de flama (FID). Se utilizó una columna Agilent DB-5MS de 30mx0.25mm, 0.25µm de diámetro interno. Se utilizó helio como gas de arrastre y una temperatura de inyección de 250°C.

5.3.6 Análisis de resultados

Los resultados de la evaluación de compuestos fenólicos y limonoides se analizaron con el programa STATISTICA 7 (StatSoft, 2004), se realizó un análisis de varianza con una comparación múltiple de medias por el método de Tukey ($p \leq 0.05$), un análisis de correlación de Pearson y un análisis multivariado (análisis de clúster por el método de Ward, análisis de componentes principales y conglomerados K-medias) para determinar las diferencias estadísticas entre las concentraciones de los individuos de diferentes procedencias y lograr una agrupación de acuerdo a las características particulares de los individuos estudiados.

En el perfil cromatográfico de EMFO se realizó una matriz de presencia-ausencia de compuestos en los diferentes tiempos de retención observados en los cromatogramas de cada muestra en particular. A esta matriz se le efectuó un análisis de conglomerados mediante el índice de Jaccard utilizando el programa PAST versión 1.34 (Hammer, Harper & Ryan, 2001).

5.4 Caracterización molecular

5.4.1 Extracción de ADN

La obtención de ADN se realizó mediante el kit de extracción DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN), el cual consiste en lo siguiente: se maceraron 20 mg de tejido seco con nitrógeno líquido, se le añaden 400 µl de buffer AP1 y 4 µl de RNasa e

incubar a 65°C durante 10 min, posteriormente agregar 130 µl de buffer AP2 e incubar en hielo durante 5 min, después centrifugar durante 5 min a 14000 rpm y se añadió el sobrenadante a la columna QIA Shredder mini spin, y se centrifugó 2 minutos a 14000 rpm. A la fracción filtrada se le añaden 1.5 volúmenes del buffer AP3 (675 µl). Transferir 650 µl a la columna DNeasy mini spin y se centrifugó a 6000 rpm durante 1 min. Se descarta la fracción que atraviesa la columna y se añaden 500 µl del buffer AW centrifugándose 8000 rpm durante 1 minuto. Se añadió a la columna otros 500 µl del buffer AW y se centrifugó 13000 rpm durante 2 minutos. Una vez centrifugado se cambia la columna a un tubo nuevo y se añaden 100 µl del buffer AE, incubándose 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó 1 minuto a 8000 rpm. Finalmente se repite la elución con el buffer AE, se recolecta en el mismo tubo y el ADN está listo para usarse.

5.4.2 Determinación de la integridad del ADN por electroforesis

La determinación de la calidad del ADN se realizó por electroforesis horizontal en gel de agarosa. Este proceso será llevado a cabo en 100 ml de gel de agarosa diluido al 1% en buffer TAE 1x (40 mM Tris base, ácido acético glacial y 2 mM ácido etilenodiaminotetraacético). Se colocaron 10 µl de muestra en cada pozeta usando como colorante de corrida azul de bromofenol 6X diluido 1:10 (Sambrook & Russell, 2001). La electroforesis se realizó a 80 V durante 45 minutos, empleando como amortiguador de electroforesis TAE 1X; una vez finalizado el proceso se visualizó el gel en un transiluminador UV y se documentaron los resultados fotográficamente.

5.4.3 Cuantificación del ADN obtenido

La estimación de la cantidad de ácidos nucleicos en las preparaciones se realizó por espectrofotometría, por medio de una NanoDrop® ND-1000, que además de valores de concentración, también da valores de relación 260nm/280nm

(ADN/proteínas), donde una relación menor a 1.8 indica que la muestra se encuentra libre de proteínas (Sambrook y Russell, 2001).

5.4.4 Amplificación de microsatélites

La caracterización de microsatélites ha sido documentada en *C. odorata* (Hernández *et al.*, 2007), de estos se seleccionaron cinco primers específicos para microsatélites los cuales fueron marcados por fluorescencia, los primer elegidos se muestran en el Cuadro 1. El marcaje utilizado en los primers se muestra en el cuadro 2. Las condiciones de reacción utilizadas se presentan en el Cuadro 3.

Cuadro 1. Secuencias de los primers elegidos para la caracterización molecular

Locus	Microsatélite	Secuencia (5' - 3')	Tamaño del alelo (pb)	Núm. Acceso Genebank
Ced 2	(GA) ₂₀	F:TTTGCTTTGAGA AACCTTGT* R:AACTTTTCGAATT GGTTAAGG F:CAAAGACCAAGA	130 – 170	EF413962
Ced 18	(GA) ₂₃	TTTGATGC* R:ACTATGGGTGG CACAACCTAC F:TCATTCTTGGAT	130 – 150	EF413963
Ced 41	(TC) ₁₈	CCTGCTAT* R:GTGGGAAAGATT GTGAAGAA F:CAATCAAACCAA	120 – 160	EF413964
Ced 61	(TG) ₁₀	AAATGGAT* R:GCAAATTAACCA GAAAAACG F:CTCGTAATAATC	240 – 270	EF413967
Ced 131	(CT) ₁₆	CCATTCCA* R:GGAGATATTTTT GGGGTTTT	80 – 120	EF413970

* Primer marcado con fluorescencia.

Cuadro 2. Tipo de marcaje utilizado para los primers microsatélites

Microsatélite	Tipo de marcaje
Ced 2	PET (ROJO)
Ced 18	VIC (VERDE)
Ced 41	FAM (AZUL)
Ced 61	NED (AMARILLO)
Ced 131	NED (AMARILLO)

Cuadro 3. Condiciones de reacción para la amplificación de los microsatélites

Reactivos	Reacción 1X (μ l)
Buffer 5X	4.0
MgCl ₂ 25 mM	1.2
PF 10 μ M	3.0
PR 10 μ M	3.0
dNTP's 20 mM	0.25
Taq 5 U/ μ l	0.2
H ₂ O	3.35
DNA (50 ng/ μ l)	5.0
Volumen final	20.0

Las condiciones de PCR para la amplificación de los 5 microsatélites se realizó de la siguiente manera: un ciclo inicial de 5 minutos a 95°C; seguido por 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, temperatura de alineación (t_m) durante 1 minuto (cuadro 4) y 1 minuto a 72°C (extensión); con un ciclo final de 7 minutos a 72 °C. Los productos por PCR se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2.0% mezclando 5 μ l del producto de PCR con 3 μ l de SyberGold™ en buffer TBE 1X pH 8.2. Las muestras se corrieron a 110 V durante 70 minutos y las bandas se visualizaron en un transiluminador UV de 254 nm.

La temperatura de alineamiento de cada uno de los microsatélites tuvo que estandarizarse individualmente, ya que usando las t_m reportadas por Hernández *et al.*, (2007) no se logró el producto esperado.

Cuadro 4. Temperatura de alineamiento utilizada para la amplificación de los microsatélites

Microsatélite	tm utilizada (°C)
Ced 2	55
Ced 18	58
Ced 41	50.7
Ced 61	50.4
Ced 131	54

5.4.5 Análisis de fragmentos automatizados

Una vez obtenidos todos los productos de amplificación de los cinco microsatélites, se combinó el producto de PCR de los cinco primers por individuo, estas mezclas se llevaron a cabo en placas de 96 pozos. Las placas de 96 pozos fueron enviados a un laboratorio externo para el análisis de los fragmentos por electroforesis capilar en un secuenciador de ADN.

En general, para el proceso de detección del tamaño del fragmento en un secuenciador automático se sigue el siguiente procedimiento: a 0.5 µl de muestra se le adiciona 9 µl de formamida Hi Di mix, 0.06 µl del marcador de peso estándar y 0.44 µl de agua desionizada grado biología molecular, para un volumen final de 10 µl por reacción. La muestra en la nueva placa se desnaturaliza a 94°C durante tres minutos para que finalmente se inyecte por capilaridad en el secuenciador automático.

5.4.6 Análisis de datos

El tamaño de los alelos, en pares de bases, se estimó por medio del programa Peak Scanner v1 software (Applied Biosystems, Foster City, CA), el cual muestra picos del color correspondiente a cada tipo de marcaje. Después, se registraron los datos de los alelos para cada individuo en cada uno de los *loci*, organizándose en un archivo Excel Microsoft® office. Los estimadores de variabilidad genética se

calcularon mediante los programas Arlequín ver. 3.5 (Excoffier *et al.*, 2010) y GenAlex (Peakall & Smouse, 2012). Se utilizó el programa Darwin (Perrier & Jacquemoud-Collet, 2006) para la construcción de dendrogramas de individuos y áreas de muestreo. Se realizó una agrupación Bayesiana en el programa STRUCTURE (Earl *et al.*, 2012) para inferir el número de poblaciones de *C. odorata*. Se aplicó la corrección de Bonferroni (Rice, 1989) en las pruebas de múltiples comparaciones, el cual es empleado para reducir el error tipo I del rechazo de una hipótesis nula verdadera.

5.5 Seguimiento fitoquímico de árboles de *C. odorata* en diferentes plantaciones.

Esta etapa de la investigación se realizó para el desarrollo del objetivo 4 y 5, los cuales fueron asociar los fitoquímicos analizados con el crecimiento maderable y con el ataque del barrenador, así como también dar seguimiento a árboles establecidos en plantaciones de diferentes localidades, para la selección de individuos para su conservación y mejoramiento.

5.5.1 Sitios de estudio

El seguimiento se llevo a cabo en cuatro plantaciones de cedro rojo establecidas en localidades contrastantes por el INIFAP. Las plantaciones fueron las siguientes:

- 1) Plantación establecida en la Agropecuaria Santa Genoveva en Campeche, cuya principal actividad es el establecimiento de plantaciones comerciales de Teca (*Tectona grandis*).
- 2) Plantación en el Campo Experimental San Felipe Bacalar en Quintana Roo, del INIFAP.
- 3) Plantación establecida en el municipio de Isla, Veracruz, en el rancho “La Torre”;
- 4) El último experimento fue establecido en el Campo Experimental El Palmar, municipio de Tezonapa, Veracruz.

La ubicación de las cuatro plantaciones analizadas se presenta en el cuadro 5. Las características de los sitios de plantación se presentan en los Cuadros 6. Las condiciones generales de manejo se resumen en el Cuadro 7.

Cuadro 5. Ubicación de las cuatro plantaciones de cedro rojo en el Golfo y Sureste de México

Plantación	Coordenadas	Altitud (msn)
Plantación Campo experimental El Palmar	18° 30' 19.27" 96° 45' 15.48"	151
Plantación en Isla, Ver.	18° 04' 50.21" 95° 32' 0.75"	56
Santa Genoveva, Camp.	19° 33' 26.53" 90° 01' 33.96"	82
Campo Experimental San Felipe Bacalar, Q. Roo	18° 45' 38.76" 88° 20' 39.81"	13

Cuadro 6. Características de los sitios de las cuatro plantaciones de cedro rojo en el Golfo y Sureste de México

Plantación	Precipitación (mm)	Temperatura promedio °C	Suelo
Plantación Campo experimental El Palmar	2800	25	Arcillo-arenoso
Plantación en Isla, Ver.	2000	25	Arenoso
Santa Genoveva, Camp.	1300	26	Arcilloso de origen calcáreo
Campo Experimental San Felipe Bacalar, Q. Roo	1400	26	Arcilloso de origen calcáreo

Cuadro 7. Condiciones de manejo de las cuatro plantaciones de cedro rojo en el Golfo y Sureste de México

Plantación	Manejo
Plantación Campo experimental El Palmar Isla, Ver.	Chapeos manuales y aplicación de herbicidas para control de malezas Al primer ataque del barrenador el productor aplico insecticida y podas. Se convenció al productor de no seguir aplicando insecticida ni podas. Después se mantuvo solo con control de malezas.
Campo Experimental San Felipe Bacalar	Chapeos esporádicos, los primeros meses de crecimiento se afecto por sequia. Después las malezas mantuvieron una alta competencia, por lo que los arboles presentaron un crecimiento mínimo.
Santa Genoveva	Riego por goteo la mayor parte del año y aplicación de herbicida. No aplicaron, sin embargo podaron ramas.

5.5.2 Colecta de material biológico y desarrollo experimental

En las cuatro plantaciones se muestrearon un total de 12 individuos, incluyendo 6 individuos de mayor crecimiento y 6 individuos de menor crecimiento, con 2 a 3 repeticiones por individuo, para un total de 131 individuos, de los cuales se colectaron hojas y se secaron a la sombra, posteriormente se obtuvieron extractos metanólicos y acetónicos, para ello se siguió la metodología previamente explicada en el punto 5.3.1. Una vez obtenidos los extractos se realizó la determinación de fenoles y limonoides, según se explica en los puntos 5.3.3 y 5.3.4, respectivamente.

5.5.3 Análisis de datos

El INIFAP proporcionó datos de crecimiento y de ataque de los individuos en las cuatro plantaciones. Las variables fueron: altura, diámetro, número de ataques, número de ramas, rectitud y recuperación. Debido a la diferencia de manejo entre las plantaciones, se agregaron dos variables cualitativas dicotómicas: presencia o ausencia de poda y presencia o ausencia de aplicación de insecticida, clasificadas solo como poda e insecticida.

Para la concentración de fenoles y limonoides se realizaron pruebas ANOVA para establecer diferencias entre los individuos y las plantaciones. Se usó el coeficiente de correlación de Pearson para variables cuantitativas y Spearman para variables cualitativas, con el fin de analizar las asociaciones entre las variables. Se realizó un análisis de correlación canónica con asignamiento de grupos de variables. Se utilizaron técnicas del análisis multivariado, análisis de clúster y análisis de componentes principales, para el análisis de similitud y agrupamiento de variables y de individuos.

6 RESULTADOS

6.1 Caracterización fitoquímica

La relación de los individuos seleccionados para la caracterización fitoquímica se muestra en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Relación de individuos de *C. odorata* seleccionados para la caracterización fitoquímica

Procedencia	Clave
Calakmul, Campeche	C8
Calakmul, Campeche	C10
Calakmul, Campeche	C11
Cárdenas, Tabasco	C62
Cárdenas, Tabasco	C67
Cárdenas, Tabasco	C46
Cárdenas, Tabasco	C64
Fron* México-Guatemala	C1
Fron* México-Guatemala	C4
Fron* México-Guatemala	C5
Papantla, Veracruz	C66
Papantla, Veracruz	C47
Teapa, Tabasco	C70
Teapa, Tabasco	C49
Teapa, Tabasco	C58
Teapa, Tabasco	C45
Tuxtepec, Oaxaca	C60
Tuxtepec, Oaxaca	C68
Tuxtepec, Oaxaca	C54
Tuxtla, Veracruz	C55
Tuxtla, Veracruz	C65
Tuxtla, Veracruz	C56

6.1.1 Evaluación de compuestos fenólicos

Las concentraciones de fenoles y flavonoides totales se muestran en Figura 15. El ANOVA indicó diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0.05$) entre de las concentraciones de los fenoles totales de los 66 individuos analizados de las siete procedencias. Los extractos de los individuos de la procedencia de Calakmul presentaron las mayores concentraciones, con valores de hasta 223mg EAG/g e del individuo C8-1 seguido por C8-6 con 206mg EAG/ge. Las menores concentraciones de fenoles totales se obtuvieron en los extractos de los individuos de la procedencia de Tuxtepec con un valor de 49mg EAG/g e del individuo C60-21.

El ANOVA de la concentración de flavonoides mostró diferencias estadísticas significativas (Tukey, $p \leq 0.05$) entre individuos y procedencias. Las mayores concentraciones de flavonoides se observaron en los individuos de la procedencia de Calakmul y Frontera México-Guatemala con valores máximos de 158 y 126mg EC/g e de los individuos C8-1 y C4-11, respectivamente. Las menores concentraciones de flavonoides se presentaron en las procedencias de Papantla y Tuxtepec, con valores mínimos de 7mg EC/g e para el individuo C66-4 y un valor de 8mg EC/g e para C60-21 (Figura 15).

Las concentraciones de proantocianidinas (Figura 16A) presentaron diferencias significativas entre individuos y procedencias (Tukey, $p \leq 0.05$). La mayor concentración es 104mg EC/g e del individuo de Calakmul C8-1, seguido por el C1-19 de Frontera México-Guatemala con un valor de 72mg EC/g e, las menores concentraciones se presentaron con los valores de 6 y 4mg EC/g e de los individuos C68-9 y C54-20 de la procedencia de Tuxtepec.

El análisis de correlación (Pearson, $p \leq 0.05$) entre la concentración de fenoles totales y flavonoides mostró una correlación significativa y positiva entre estas dos variables ($r^2 = 0.88$). Asimismo, se observó una correlación significativa (Pearson, $p \leq 0.05$) entre fenoles totales, flavonoides y proantocianidinas ($r^2 = 0.7$), por lo que a mayor concentración de fenoles totales hubo una mayor concentración de flavonoides y proantocianidinas en los individuos evaluados.

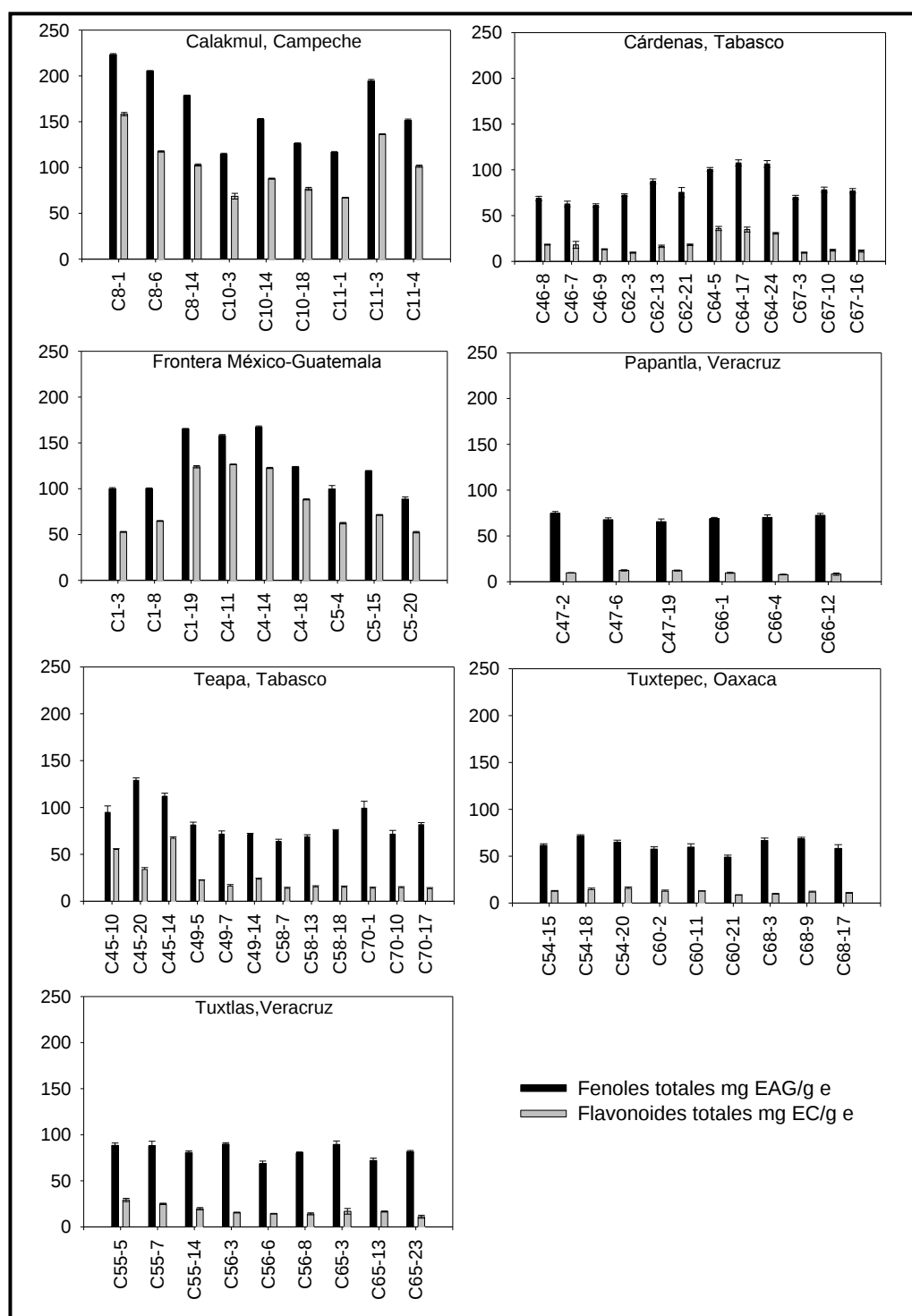


Figura 15. Concentración de fenoles totales y flavonoides, en hojas de *C. odorata*, de siete procedencias.

6.1.2 Evaluación de limonoides

Los resultados de la evaluación de limonoides se muestran en la Figura 16B. El ANOVA presentó diferencias estadísticamente significativas (Tukey, $p \leq 0.05$). Las mayores concentraciones de limonoides se presentaron en los individuos de la procedencia de Cárdenas, con valores de 748mg EL/g e para C64-5 y 711mg EL/g e en C62-21, seguidos por el individuo de Tuxtepec C45-14 con una concentración de 702mg EL/g e. La concentración menor se observó en el individuo de Calakmul C11-1 con un valor de 227mg EL/g e. El análisis de correlación (Pearson, $p \leq 0.05$) entre la concentración de limonoides y fenoles totales no mostró una correlación significativa entre estas variables ($r^2 = 0.3$).

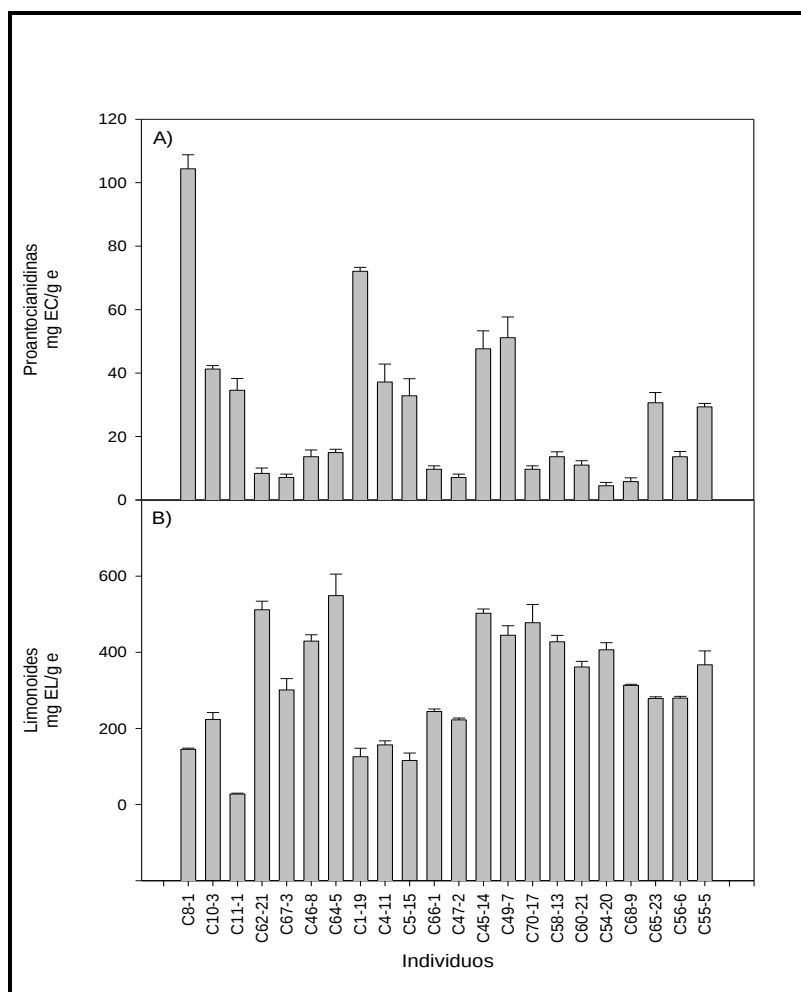


Figura 16. (A) Concentración de proantocianidinas en hojas de *C. odorata*. **(B)** Concentración de limonoides en hojas de *C. odorata*.

6.1.3 Análisis de datos de la caracterización fitoquímica

La aplicación de las tres técnicas del análisis multivariado a las cuatro variables de estudio (fenoles totales, flavonoides, proantocianidinas y limonoides) permitió inferir el agrupamiento de los individuos analizados en tres grupos, los cuales se observan en la Figura 17.

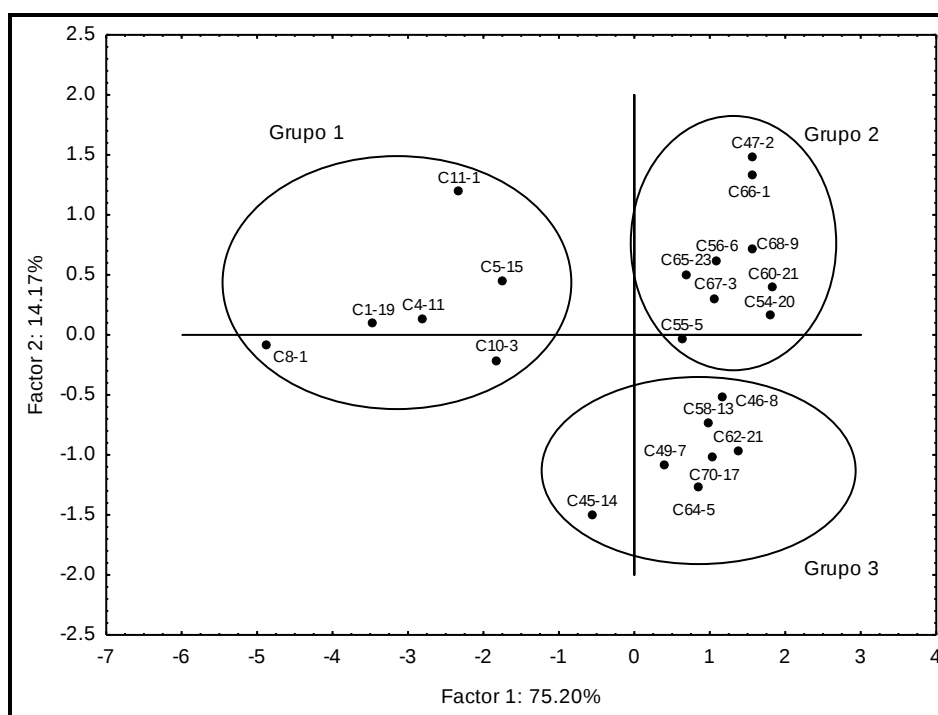


Figura 17. Agrupamiento de los individuos de *C. odorata*, en función de los dos componentes principales obtenidos con la matriz de correlación de las cuatro variables (fenoles totales, flavonoides, proantocianidinas y limonoides).

6.1.4 Evaluación cromatográfica

El análisis de los cromatogramas de HPLC (figura 18) indicó semejanza química entre los extractos fenólicos evaluados de las diferentes procedencias, destacando la presencia de un compuesto mayoritario que eluyó a un tiempo de 20.2min (figura 18 compuesto 2), este compuesto se observó en todos los individuos sólo que a diferentes concentraciones. El espectro ultravioleta de este compuesto

presentó absorbancias máximas de 265 y 350nm (figura 19), señales que corresponden a un compuesto flavonoide del grupo flavonol, de tipo glicósido de kaempferol.

En los cromatogramas se identificó también la presencia de catequina, con tiempo de retención de 13.9min (figura 18 compuesto 1), este compuesto se identificó con base a su espectro de UV (figura 20), así como por la comparación del tiempo de retención con el estándar de catequina.

El análisis de conglomerados, de la matriz binaria resultante de los perfiles cromatográficos de HPLC, se presentaron tres grupos claramente diferenciados (figura 21).

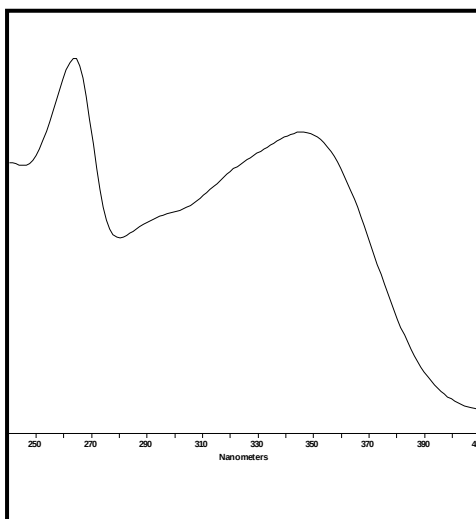


Figura 19. Espectro de UV del compuesto 2 (glicósido de kaempferol)

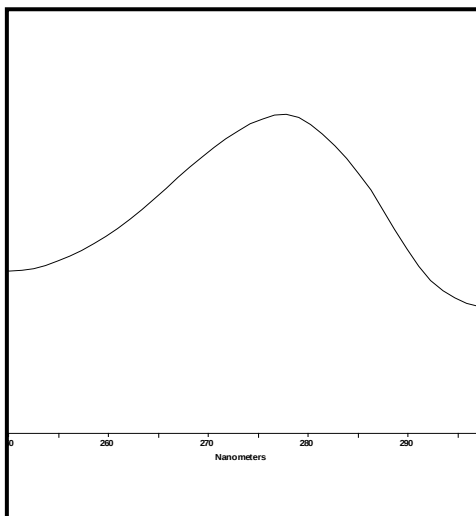


Figura 20. Espectro de UV del compuesto 1 (catequina)

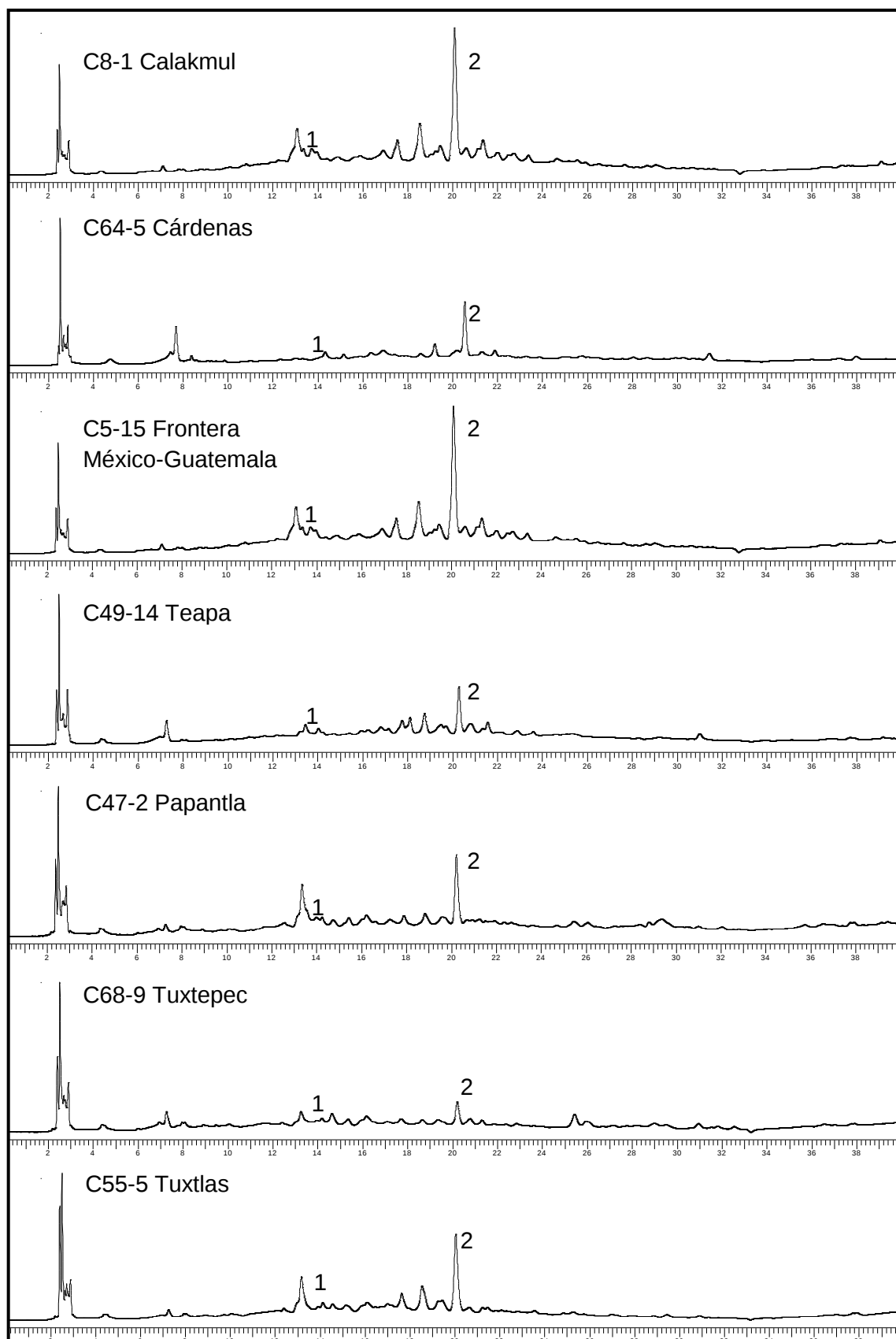
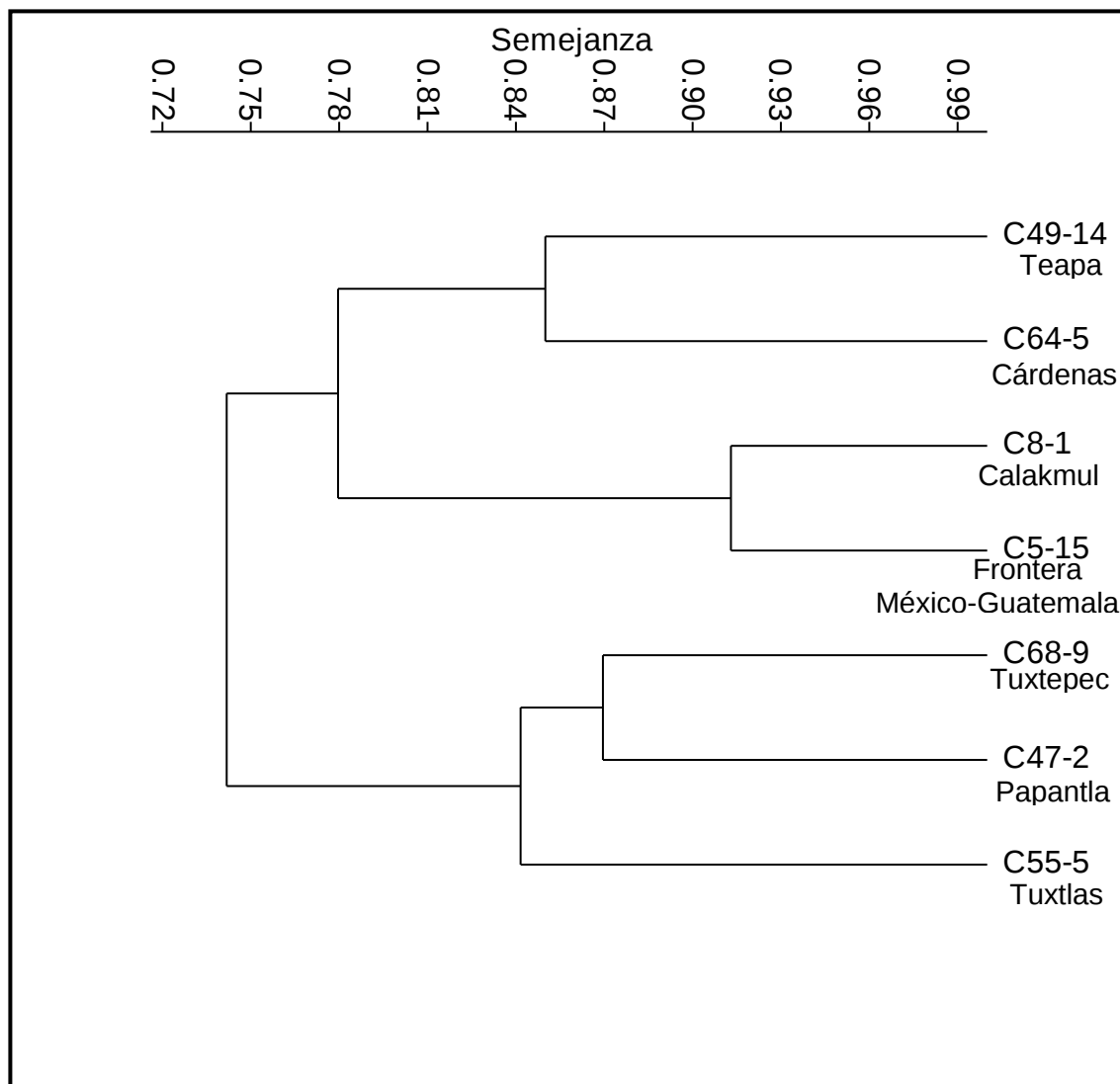
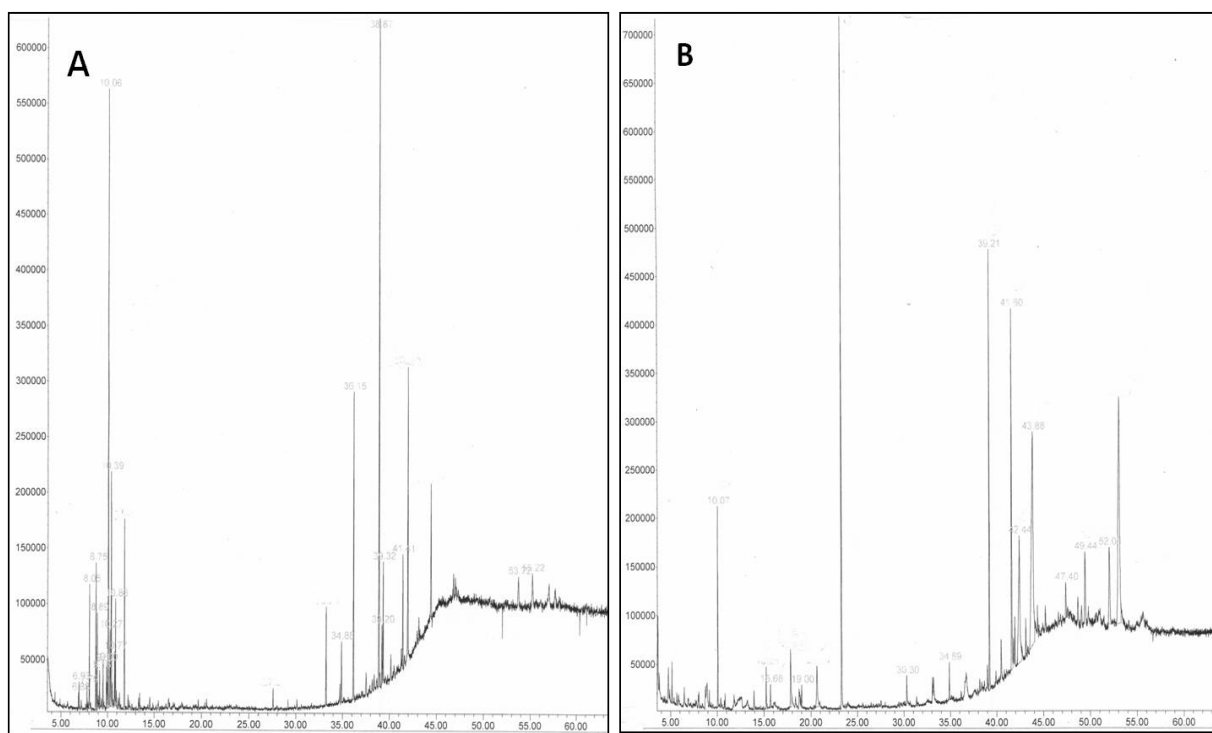


Figura 18. Cromatogramas de HPLC de extractos metanólicos fracción orgánica**Figura 21.** Análisis de clúster de la semejanza cromatográfica de los extractos fenólicos de hojas de *C. odorata*, con base al índice de Jaccard.

Los cromatogramas de CG-MS se presentan en la Figura 22. Los resultados obtenidos se presentan en el Cuadro 9, se identificó la presencia de los compuestos mediante la comparación de los espectros de masas obtenidos, con los espectros de la base de datos del equipo de CG-MS utilizado. Se identificaron los siguientes compuestos: β -elemeno, E-cariofileno, aromadendreno, humuleno, D-germacreno, Di- α -Tocoferol y β -sitosterol.



6.2 Caracterización molecular

La relación de los individuos para la caracterización molecular se presenta en el Cuadro 10, en el cual se incluye su correspondencia con la clave usada en la parte fitoquímica.

Cuadro 10. Relación de los individuos de *C. odorata* usados en la caracterización molecular y la clave correspondiente en el estudio fitoquímico.

Clave en molecular	Clave en fitoquímica	Clave en molecular	Clave en fitoquímica	Clave en molecular	Clave en fitoquímica
CoSF1Mex	C1	CoP53TCar	--	CoP84VTez	--
CoSF2Gua	C2	CoP54OTux	C54	CoP85VTez	--
CoSF3CCalk	--	CoP55VTux	C55	CoP86VTez	--
CoSF4Mex	C4	CoP56VTux	C56	CoP88VTez	--
CoSF5Mex	C5	CoP57TCar	--	CoP89OTux	--
CoSF6CCalk	--	CoP58TTea	C58	CoP90OTux	--
CoSF7CCalk	--	CoP59VTez	--	CoP91OTux	--
CoSF8CCalk	C8	CoP60OTux	C60	CoP92VTez	--
CoSF9CCalk	--	CoP61TCar	--	CoP93VTez	--
CoSF10CCalk	C10	CoP62TCar	C62	CoP94VTez	--
CoT31	--	CoP63TCar	--	CoP95OTux	C95
CoT32	--	CoP64TCar	C64	CoP96VTez	--
CoT33	--	CoP65VTux	C65	CoP97OTux	--
CoT34	--	CoP66VPap	C66	CoP98VTez	--
CoT35	--	CoP67TCar	C67	CoP99VTez	--
CoT36	--	CoP68OTux	C68	CoP100VTez	--
CoT37	--	CoP69ChPal	--	CoP101VTez	--
CoT38	--	CoP70TTea	C70	CoP102VTB	--
CoT39	--	CoP71OTux	--	CoP103Golf	C103
CoT40	--	CoP72OTux	--	CoP104VTez	--
CoP41TCar	C41	CoP73VTez	--	CoP105OTux	--
CoP42TCar	--	CoP74VTez	--	CoP106VTez	--
CoP43ChPal	--	CoP75VTez	--	CoP107OTux	--
CoP44VPap	--	CoP76VTez	--	CoP108VTez	--
CoP45TTea	C45	CoP77OMar	--	CoP109VTez	--
CoP46TCar	C46	CoP78VTez	--	CoP110VTez	--
CoP47VPap	C47	CoP79VTez	--	CoP111VTez	--
CoP49TTea	C49	CoP80VTez	--	CoP112Golf	--
CoP50VCal	--	CoP81VTez	--	CoP113Golf	--
CoP51TCar	--	CoP82VTez	C82	CoP114VTez	--
CoP52VMis	C52	CoP83OTux	--	CoP115VTez	C115

* Co: *C. odorata*, P, SF y T: Clave para el INIFAP, Mex: Frontera México-Guatemala, Golf: Golfo de México, CCalk: Calakmul, Campeche, TCar: Cárdenas, tabasco, ChPal: Palenque, Chiapas, VPap: Papantla, Veracruz, TTea: Teapa, Tabasco, VMis: Misantla, Veracruz, OTux: Tuxtepec, Oaxaca, VTux: Tuxtla, Veracruz, VTez: Tezonapa, Veracruz; Omar: María Lombardo, Oaxaca

6.2.1 Integridad del ADN obtenido

Se realizaron pruebas para decidir que parte de la planta usar para la extracción de ADN (yemas o foliolos). El ADN obtenido en ambos tejidos fue de buena calidad, sin embargo al ser probado por PCR se lograron mejores resultados con el ADN obtenido a partir de foliolos, el ADN de yemas presento un inhibidor de PCR, por lo cual se realizó la extracción usando los foliolos. De esta manera, se logró obtener un banco de ADN de 93 individuos de *C. odorata*, incluidos para la caracterización molecular de la plantación. La integridad del ADN de algunos individuos se muestra en la Figura 23.

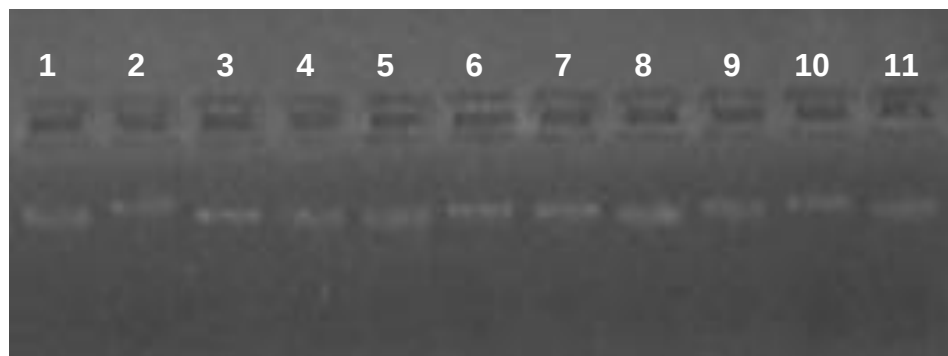


Figura 23. ADN de foliolos de *C. odorata*. 1: CoP41TCar, 2: Cop42TCar, 3: CoP46TCar, 4: CoP51TCar, 5: CoP53TCar, 6: CoP57TCar, 7: CoP61TCar, 8: CoP62TCar, 9: CoP63TCar, 10: CoP64TCar, 11: CoP67TCar.

6.2.2 Amplificación de los microsatélites

La visualización de los 5 microsatélites se documento mediante fotografías de los geles de agarosa en el transiluminador UV (Figura 24). Los tamaños obtenidos en geles de agarosa de los 5 microsatélites se muestran en el Cuadro 11.

Cuadro 11. Tamaño en pb de los microsatélites en agarosa al 2%

Microsatélite	Tamaño en pb en agarosa	Microsatélite	Tamaño en pb en agarosa
Ced 2	100 - 200	Ced 61	200 – 400
Ced 18	400 - 500	Ced 131	100
Ced 41	100 - 200		

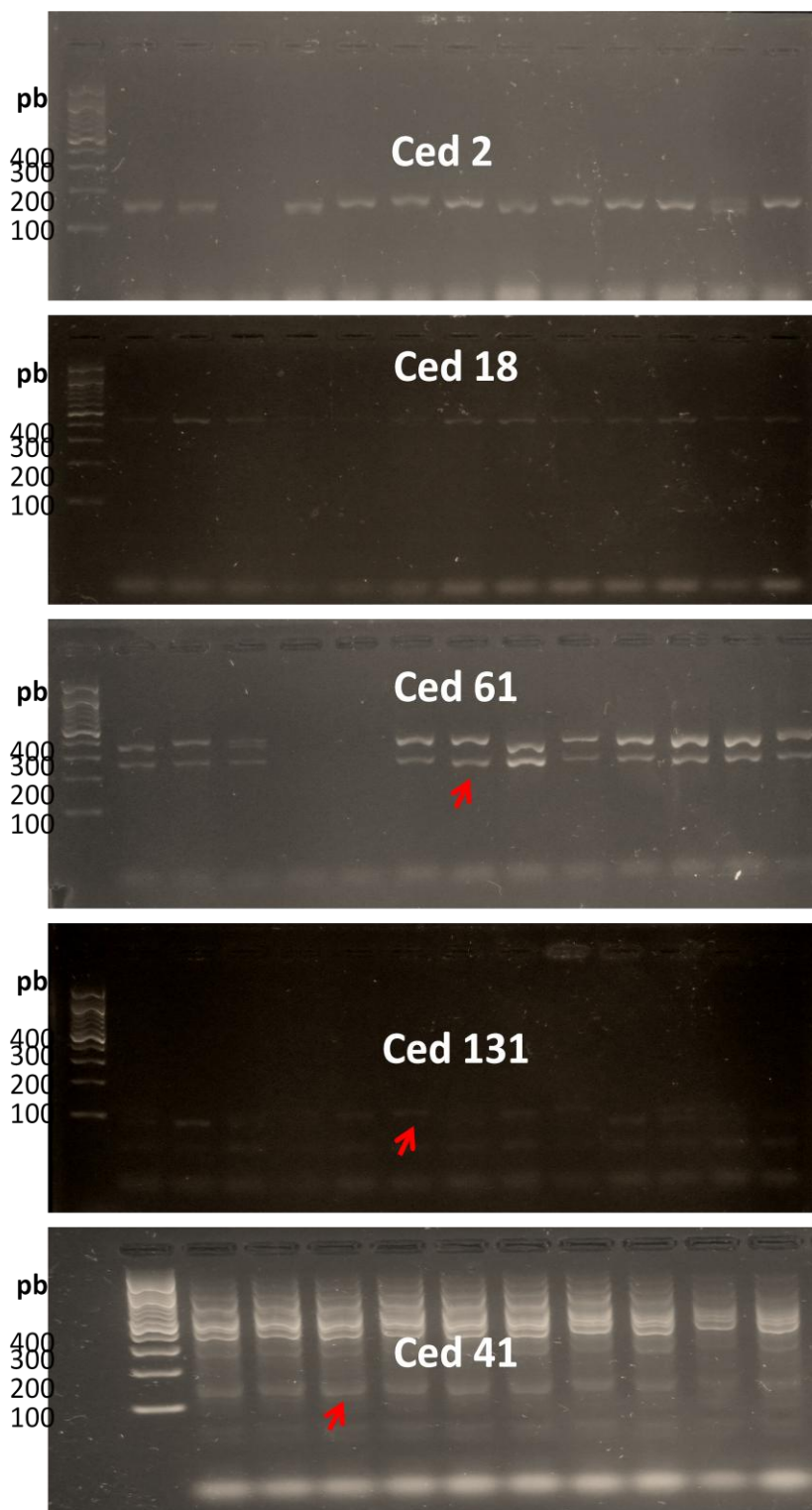


Figura 24. Visualización de los microsatélites Ced 2, Ced 18, Ced 41, Ced 61 y Ced 131. Agarosa 2.0 %, 110 V durante 70 minutos. En perfiles con 2 o más bandas el microsatélite es señalado

6.2.3 Análisis de fragmentos automatizados.

El análisis de fragmentos automatizados nos permitió obtener el tamaño exacto en pares de (pb) de cada microsatélites en los 93 individuos (cuadro 12). El número de alelos por locus se presenta en el Cuadro13. En la figura 25 se muestran algunos de los electroferogramas obtenidos, donde se ejemplifica a individuos homocigotos y heterocigotos. De los cinco microsatélites evaluados, tres resultaron polimórficos Ced 2, Ced 61 y Ced 131; los microsatélites Ced 18 y Ced 41 resultaron monomórficos presentando solo un alelo por locus.

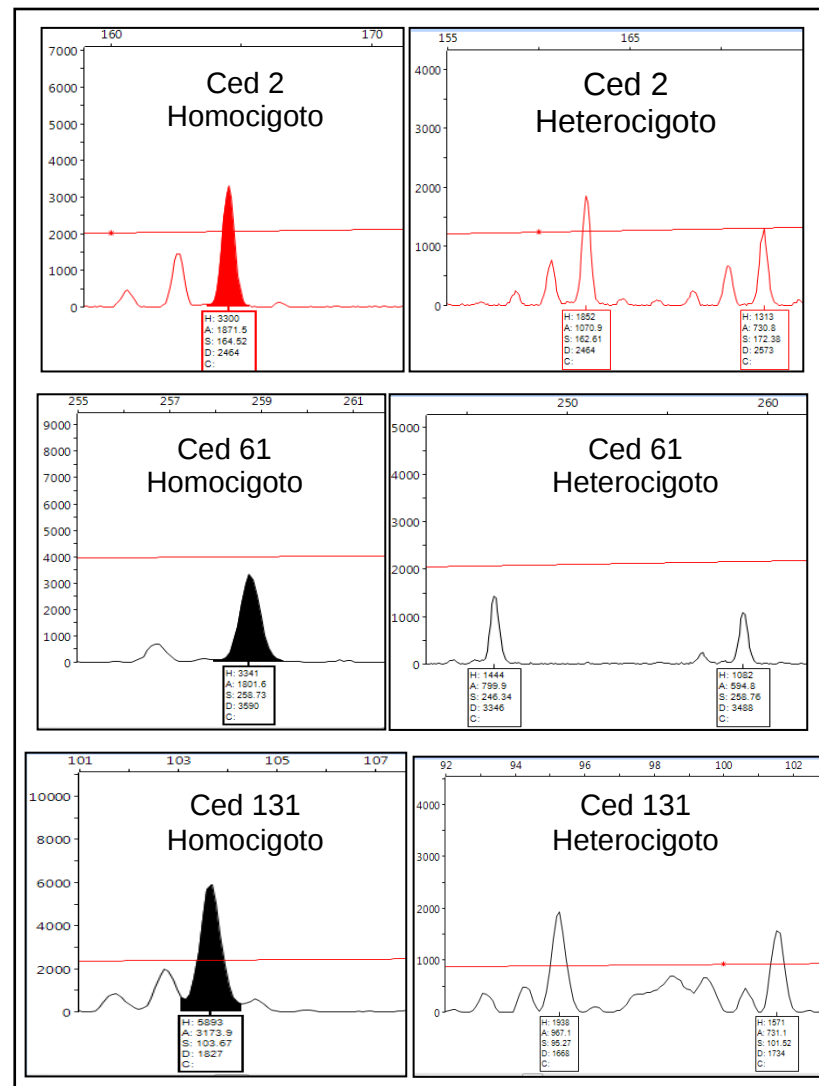


Figura 25. Electroferogramas de los microsatélites para Ced 2, Ced 61 Ced131, a la izquierda se observan individuos homocigotos y a la derecha heterocigotos.

Cuadro 12. Individuos de *C. odorata* genotipificados con cinco marcadores microsatélites (Ced 2, Ced 18, Ced 41, Ced 61, Ced 131)

Individuo	Ced 2		Ced 18		Ced 41		Ced 61		Ced 131	
CoP100VTez	164	164	147	147	141	141	258	258	105	105
CoP101VTez	162	172	147	147	141	141	246	262	103	103
CoP104VTez	170	170	147	147	141	141	246	258	95	103
CoP106VTez	162	172	147	147	141	141	254	258	103	103
CoP108VTez	168	172	147	147	141	141	246	258	105	105
CoP109VTez	164	172	147	147	141	141	258	262	105	107
CoP110VTez	162	166	147	147	141	141	258	262	105	105
CoP111VTez	162	162	147	147	141	141	246	254	107	107
CoP114VTez	172	172	147	147	141	141	258	258	101	101
CoP115VTez	160	166	147	147	141	141	254	258	95	95
CoP59VTez	162	172	147	147	141	141	262	262	103	103
CoP73VTez	162	162	147	147	141	141	246	252	105	105
CoP74VTez	162	164	147	147	141	141	258	258	107	105
CoP75VTez	166	166	147	147	141	141	246	254	95	95
CoP76VTez	144	174	147	147	141	141	252	262	95	105
CoP78VTez	162	172	147	147	141	141	252	254	95	107
CoP79VTez	164	172	147	147	141	141	256	256	95	105
CoP80VTez	164	172	147	147	141	141	246	256	95	105
CoP81VTez	164	164	147	147	141	141	258	258	95	105
CoP82VTez	164	172	147	147	141	141	246	246	103	105
CoP84-Vtez	172	172	147	147	141	141	246	246	103	103
CoP85VTez	172	172	147	147	141	141	258	258	95	101
CoP86VTez	168	172	147	147	141	141	258	258	95	105
CoP88VTez	160	166	147	147	141	141	254	262	95	105
CoP92-Vtez	164	174	147	147	141	141	252	254	95	107
CoP93VTez	172	172	147	147	141	141	246	258	95	97
CoP94VTez	172	172	147	147	141	141	252	252	103	103
CoP96VTez	162	164	147	147	141	141	246	258	105	105
CoP98VTez	168	172	147	147	141	141	254	258	101	105
CoP99VTez	158	164	147	147	141	141	246	258	95	105
Cop66VPap	144	162	147	147	141	141	258	258	105	105

Cuadro 12. Continuación...

Individuo	Ced 2		Ced 18		Ced 41		Ced 61		Ced 131	
CoP44VPap	144	160	147	147	141	141	246	258	105	105
CoP47VPap	162	164	147	147	141	141	256	260	95	95
CoP55VTux	162	168	147	147	141	141	254	258	95	103
CoP56VTux	162	174	147	147	141	141	254	256	95	105
CoP65VTux	162	164	147	147	141	141	252	256	103	105
CoP50VCal	162	164	147	147	141	141	256	262	107	107
CoP52VMis	144	174	147	147	141	141	256	260	103	105
CoP102VTB	164	164	147	147	141	141	252	252	95	95
CoP103Golf	162	168	147	147	141	141	254	254	103	103
CoP112Golf	160	164	147	147	141	141	258	258	95	105
CoP113Golf	166	172	147	147	141	141	252	256	105	105
CoP41TCar	162	172	147	147	141	141	260	262	103	103
CoP42TCar	148	162	147	147	141	141	256	262	105	107
CoP46TCar	164	176	147	147	141	141	246	258	105	107
CoP51TCar	162	164	147	147	141	141	246	252	95	105
CoP53TCar	162	162	147	147	141	141	246	252	95	105
CoP57TCar	162	168	147	147	141	141	254	256	99	105
CoP61TCar	162	162	147	147	141	141	256	260	95	105
CoP62TCar	162	162	147	147	141	141	252	252	95	107
CoP63TCar	158	162	147	147	141	141	256	256	105	107
CoP64TCar	164	176	147	147	141	141	254	258	105	105
CoP67TCar	164	170	147	147	141	141	256	262	97	107
CoP70TTea	144	164	147	147	141	141	258	258	103	103
CoP45TTea	160	164	147	147	141	141	256	264	105	107
CoP49TTea	166	172	147	147	141	141	252	258	95	101
CoP58TTea	160	174	147	147	141	141	256	256	105	107
CoP105OTux	144	144	147	147	141	141	246	258	105	105
CoP107OTux	144	158	147	147	141	141	252	262	95	103
CoP54OTux	162	164	147	147	141	141	246	252	97	103
CoP60OTux	160	160	147	147	141	141	246	252	105	105
CoP68OTux	160	164	147	147	141	141	246	252	105	105
CoP71OTux	164	164	147	147	141	141	256	262	95	105

Cuadro 12. Continuación...

Individuo	Ced 2		Ced 18		Ced 41		Ced 61		Ced 131	
CoP72OTux	160	164	147	147	141	141	246	256	105	107
CoP83OTux	160	160	147	147	141	141	246	256	95	95
CoP89OTux	162	174	147	147	141	141	252	262	103	103
CoP90OTux	164	174	147	147	141	141	256	258	105	105
CoP91OTux	162	162	147	147	141	141	252	256	101	101
CoP95OTux	174	174	147	147	141	141	252	262	95	95
CoP97OTux	160	164	147	147	141	141	256	258	107	107
CoP77OMar	160	174	147	147	141	141	258	258	105	105
CoP43ChPal	144	162	147	147	141	141	256	258	103	105
CoP69ChPal	144	162	147	147	141	141	252	256	95	103
CoSF4Mex	148	164	147	147	141	141	254	256	105	107
CoSF5Mex	158	164	147	147	141	141	246	260	95	105
CoSF8CCalk	160	164	147	147	141	141	256	258	107	107
CoSF10CCalk	144	172	147	147	141	141	256	256	103	105
CoSF1Mex	144	170	147	147	141	141	246	254	105	105
CoSF2Gua	160	162	147	147	141	141	252	254	105	105
CoSF3CCalk	162	164	147	147	141	141	256	256	103	103
CoSF6CCalk	164	170	147	147	141	141	254	256	99	99
CoSF7CCalk	162	164	147	147	141	141	252	254	101	103
CoSF9CCalk	168	170	147	147	141	141	256	258	95	105
CoT31	144	162	147	147	141	141	254	256	99	99
CoT32	162	172	147	147	141	141	256	256	105	105
CoT33	158	172	147	147	141	141	246	256	95	95
CoT34	162	168	147	147	141	141	256	256	105	105
CoT35	158	162	147	147	141	141	254	254	99	99
CoT36	160	162	147	147	141	141	254	260	99	105
CoT37	156	162	147	147	141	141	254	258	105	105
CoT38	162	172	147	147	141	141	254	254	105	105
CoT39	162	172	147	147	141	141	256	256	105	105
CoT40	158	172	147	147	141	141	256	256	95	105

Cuadro 13. Numero de alelos por microsatélite

Alelos	Ced 2	Ced 18	Ced 41	Ced 61	Ced 131
95	0	0	0	0	1
97	0	0	0	0	1
99	0	0	0	0	1
101	0	0	0	0	1
103	0	0	0	0	1
105	0	0	0	0	1
107	0	0	0	0	1
141	0	0	1	0	0
144	1	0	0	0	0
147	0	1	0	0	0
148	1	0	0	0	0
156	1	0	0	0	0
158	1	0	0	0	0
160	1	0	0	0	0
162	1	0	0	0	0
164	1	0	0	0	0
166	1	0	0	0	0
168	1	0	0	0	0
170	1	0	0	0	0
172	1	0	0	0	0
174	1	0	0	0	0
176	1	0	0	0	0
246	0	0	0	1	0
252	0	0	0	1	0
254	0	0	0	1	0
256	0	0	0	1	0
258	0	0	0	1	0
260	0	0	0	1	0
262	0	0	0	1	0
264	0	0	0	1	0
Total	13	1	1	8	7

6.2.4 Variabilidad genética

Para el análisis de la variabilidad genética se agrupó a los 93 individuos en 6 áreas de muestro: área 1: Veracruz, 42 individuos (VER); área 2: Tabasco, 15 individuos (TAB); área 3: Oaxaca, 14 individuos (OAX), área 4: Chiapas, Frontera México-Guatemala y Guatemala, 6 individuos (FMEX); área 5: Campeche, 6 individuos (CAMP), área 6: Procedencia desconocida, 10 individuos (DESC)

Los estimadores de la diversidad genética para cada uno de los microsatélites en las áreas de muestreo se muestran en el Cuadro 14 y promediando los cinco microsatélites de muestra en el Cuadro 15. En general, el número de alelos por locus (Na) presentó valores de 5.8 (TAB) a 3.4 (DESC); el número de alelos efectivos (Ne) varió entre 3.4 (TAB) y 2.1 (DESC); el mayor Índice de Shannon fue de 1.104 (TAB) y el menor fue 0.740 (DESC), la heterocigosidad observada (Ho) varió de 0.533 (FMEX) a 0.320 (DESC), mientras que la heterocigosidad esperada (He) estuvo entre 0.478 (TAB) y 0.384 (DESC); los valores del Índice de fijación (F) se presentaron entre 0.239 (OAX) y -0.193 (FMEX) (cuadro 14 y 15)

Cuadro 14. Estimadores de la variabilidad genética de cinco microsatélite de *C. odorata* en seis áreas de muestreo.

Área	Parámetro	Locus				
		Ced 2	Ced 18	Ced 41	Ced 61	Ced 131
VER	N	42	42	42	42	42
	Na	10	1	1	7	6
	Ne	5.663	1.000	1.000	5.033	3.794
	I	1.944	0.000	0.000	1.757	1.468
	Ho	0.714	0.000	0.000	0.643	0.500
	He	0.823	0.000	0.000	0.801	0.736
	uHe	0.833	0.000	0.000	0.811	0.745
	F	0.133	--	--	0.198	0.321

*N: Tamaño de muestra, Na: Número de Alelos, Ne: Alelos efectivos, I: Índice de Shannon, He: Heterocigosidad esperada, Ho: Heterocigosidad observada, uHe: Heterocigosidad esperada sesgada, F: Índice de fijación.

Área	Parámetro	Locus				
------	-----------	-------	--	--	--	--

		Ced 2	Ced 18	Ced 41	Ced 61	Ced 131
TAB	N	15	15	15	15	15
	Na	12	1	1	8	7
	Ne	5.114	1.000	1.000	5.696	4.206
	I	2.025	0.000	0.000	1.893	1.615
	Ho	0.800	0.000	0.000	0.733	0.800
	He	0.804	0.000	0.000	0.824	0.762
	uHe	0.832	0.000	0.000	0.853	0.789
	F	0.006	--	--	0.111	-0.050
OAX	N	14	14	14	14	14
	Na	6	1	1	5	6
	Ne	4.780	1.000	1.000	4.840	3.733
	I	1.648	0.000	0.000	1.592	1.518
	Ho	0.571	0.000	0.000	0.929	0.286
	He	0.791	0.000	0.000	0.793	0.732
	uHe	0.820	0.000	0.000	0.822	0.759
	F	0.277	--	--	-0.170	0.610
FMEX	N	6	6	6	6	6
	Na	7	1	1	6	4
	Ne	5.538	1.000	1.000	5.143	2.483
	I	1.820	0.000	0.000	1.705	1.119
	Ho	1.000	0.000	0.000	1.000	0.667
	He	0.819	0.000	0.000	0.806	0.597
	uHe	0.894	0.000	0.000	0.879	0.652
	F	-0.220	--	--	-0.241	-0.116
CAMP	N	6	6	6	6	6
	Na	7	1	1	4	6
	Ne	5.143	1.000	1.000	2.483	4.800
	I	1.792	0.000	0.000	1.119	1.676
	Ho	1.000	0.000	0.000	0.667	0.500
	He	0.806	0.000	0.000	0.597	0.792
	uHe	0.879	0.000	0.000	0.652	0.864
	F	-0.241	--	--	-0.116	0.368
DESC	N	10	10	10	10	10
	Na	7	1	1	5	3
	Ne	3.922	1.000	1.000	2.632	2.247
	I	1.597	0.000	0.000	1.163	0.938
	Ho	1.000	0.000	0.000	0.400	0.200
	He	0.745	0.000	0.000	0.620	0.555
	uHe	0.784	0.000	0.000	0.653	0.584
	F	-0.342	--	--	0.355	0.640

Cuadro 15. Estimadores de la variabilidad genética de *C. odorata* por áreas de muestreo promediando los estimadores de cada microsatélite.

Área	N	Na	Ne	I	Ho	He	uHe	F
VER	42.000	5.000	3.298	1.034	0.371	0.472	0.478	0.217
TAB	15.000	5.800	3.403	1.107	0.467	0.478	0.495	0.022
OAX	14.000	3.800	3.071	0.952	0.357	0.463	0.480	0.239
FMEX	6.000	3.800	3.033	0.929	0.533	0.444	0.485	-0.193
CAMP	6.000	3.800	2.885	0.917	0.433	0.439	0.479	0.004
DESC	10.000	3.400	2.160	0.740	0.320	0.384	0.404	0.217

*N: Tamaño de muestra, Na: Número de Alelos, Ne: Alelos efectivos, I: Índice de Shannon, He: Heterocigosidad esperada, Ho: Heterocigosidad observada, uHe: Heterocigosidad esperada sesgada, F: Índice de fijación.

Los estimadores de la variabilidad genética total de la plantación se muestra en el Cuadro 16, los parámetros es el promedio de los estimados en cada una de las áreas de muestreo. En general, el valor más alto de número de alelos (Na) se presentó en Ced 2 con un promedio de 8.16 y el más bajo en Ced 131 con una Na promedio de 5.33. De igual manera Ced 2 presentó los mayores valores en los demás parámetros y Ced 131 presentó los valores más reducidos.

Cuadro 16. Promedio de los estimadores de la variabilidad genética total en la plantación de *C. odorata*.

	ced 2	ced 18	ced 41	ced 61	ced 131	Total
N	15.500	15.500	15.500	15.500	15.500	15.500
Na	8.167	1.000	1.000	5.833	5.333	4.267
Ne	5.027	1.000	1.000	4.304	3.544	2.975
I	1.804	0.000	0.000	1.538	1.389	0.946
Ho	0.848	0.000	0.000	0.729	0.492	0.414
He	0.798	0.000	0.000	0.740	0.696	0.447
uHe	0.840	0.000	0.000	0.778	0.732	0.470
F	-0.065	--	--	0.023	0.295	0.084

*Tamaño de muestra (N). Número de Alelos (Na). Alelos efectivos (Ne). Índice de Shannon (I). Heterocigosidad esperada (He). Heterocigosidad observada (Ho). Heterocigosidad esperada sesgada (uHe).

6.2.5 Frecuencias alélicas

La frecuencia alélica total para cada locus se muestra en la Figura 27. La frecuencia de cada locus por áreas se presenta en el Cuadro 17 y en la Figura 27.

El locus Ced 2, fue el locus más diverso con 13 alelos (144, 148, 156, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172, 174 y 176 pb). Los alelos más frecuentes fueron el alelo 162 con una frecuencia total de 0.24 y el alelo 164 con una frecuencia total de 0.20. Las menores frecuencias las presentaron los alelos 156 y 176, con una frecuencia de 0.006 y 0.0012 respectivamente, siendo el 156 un alelo privado para TAB y el 176 para DESC 176 (figura 26A). En TAB se presentaron 12 de estos alelos, seguido por VER que presentó 10 alelos, después FMAX, CAMP y DESC con 7 alelos, y por último OAX con 6 alelos (cuadro 17).

El locus Ced 61 presento un total de 8 alelos (246, 252, 254, 256, 258, 260, 262 y 264 pb). Los alelos más frecuentes fueron 256 con una frecuencia total de 0.22, seguido por el alelo 258 con una frecuencia total de 0.20. El alelo con menor frecuencia fue 264 con una frecuencia total de 0.0063 (figura 26B), siendo un alelo privado presente en TAB con una frecuencia de 0.033 dentro de esta área. Los 8 alelos se presentaron en TAB, seguida por VER donde se presentaron 7 alelos, en FMEX se observaron 6 alelos, en OAX y DESC se presentaron 5 alelos, y por ultimo en CAMP se observaron 4 alelos (cuadro 17).

Finalmente, el locus Ced 131 fue el menos diverso con 7 alelos (95, 97, 99, 101, 103, 105, 104 y 107 pb). Tomando en cuenta todas las áreas el alelo más frecuente fue el alelo 105 con una frecuencia de 0.39 y el alelo menos frecuente fue el alelo 97 con una frecuencia de 0.021 (figura 26C). Los 7 alelos estuvieron presentes en TAB, VER y OAX; en CAMP se observaron 6 alelos, en FMEX se observaron 4 alelos y finalmente en DESC se presentaron 3 alelos (cuadro 17).

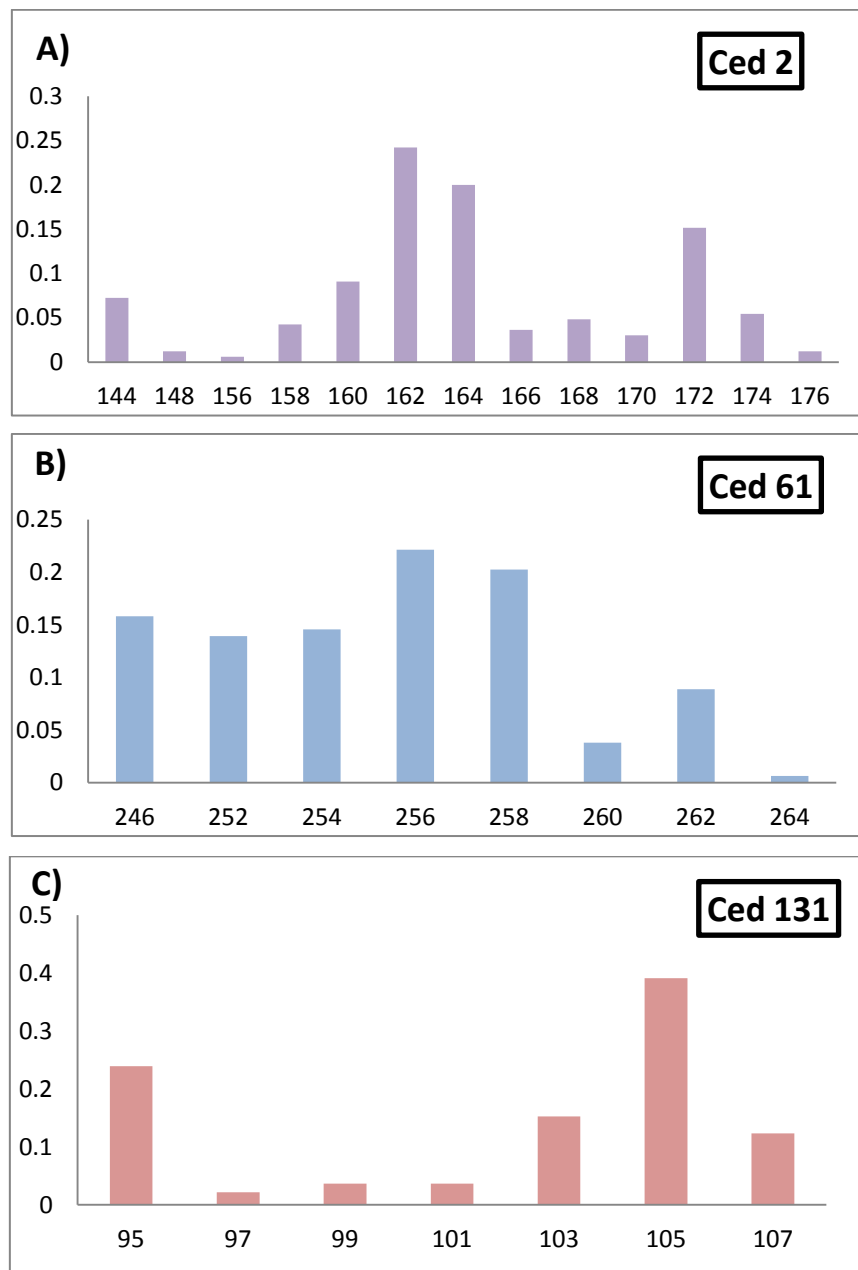


Figura 26. Patrones de distribución de la frecuencia total de los alelos de tres microsatélites de *C. odorata*. Eje X: tamaños de los alelos en pares de bases, Eje Y: son las frecuencias alélicas.

Cuadro 17. Frecuencias alélicas de tres microsatélites en *C. odorata* en cinco áreas de muestreo.

Locus Ced 2						
Alelo	VER	TAB	OAX	FMEX	CAMP	DESC
144	0.048	0.033	0.107	0.250	0.083	0.050
148	0.000	0.033	0.000	0.083	0.000	0.000
156	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.050
158	0.012	0.033	0.036	0.083	0.000	0.150
160	0.048	0.067	0.286	0.083	0.083	0.050
162	0.214	0.367	0.143	0.250	0.167	0.400
164	0.214	0.200	0.250	0.167	0.333	0.000
166	0.071	0.033	0.000	0.000	0.000	0.000
168	0.060	0.033	0.000	0.000	0.083	0.050
170	0.024	0.033	0.000	0.083	0.167	0.000
172	0.262	0.067	0.000	0.000	0.083	0.250
174	0.048	0.033	0.179	0.000	0.000	0.000
176	0.000	0.067	0.000	0.000	0.000	0.000
Locus Ced 61						
Alelo	VER	TAB	OAX	FMEX	CAMP	DESC
246	0.179	0.100	0.214	0.167	0.000	0.050
252	0.119	0.167	0.250	0.167	0.083	0.000
254	0.143	0.067	0.000	0.250	0.167	0.350
256	0.107	0.300	0.214	0.250	0.583	0.500
258	0.333	0.167	0.179	0.083	0.167	0.050
260	0.024	0.067	0.000	0.083	0.000	0.050
262	0.095	0.100	0.143	0.000	0.000	0.000
264	0.000	0.033	0.000	0.000	0.000	0.000
Locus Ced 131						
Alelo	VER	TAB	OAX	FMEX	CAMP	DESC
95	0.274	0.167	0.214	0.167	0.083	0.150
97	0.012	0.033	0.036	0.000	0.000	0.000
99	0.000	0.033	0.000	0.000	0.167	0.250
101	0.048	0.033	0.071	0.000	0.083	0.000
103	0.202	0.133	0.143	0.167	0.333	0.000
105	0.369	0.367	0.429	0.583	0.167	0.600
107	0.095	0.233	0.107	0.083	0.167	0.000

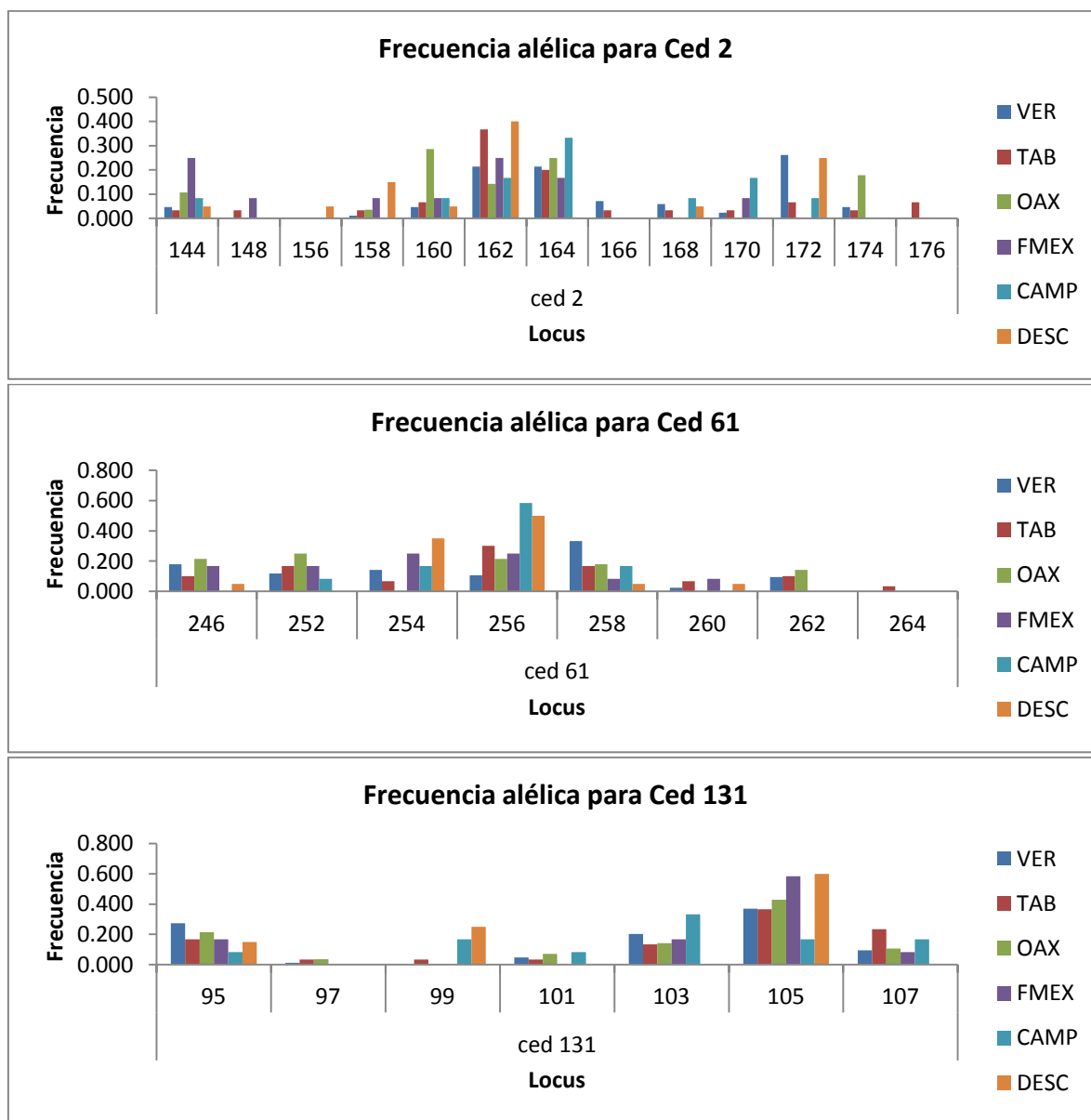


Figura 27. Frecuencias alélicas de tres locus microsatélites en *C. odorata* en cinco áreas de muestreo.

6.2.6 Equilibrio de Hardy-Weinberg

Los resultados de esta prueba de cada locus por área, indicaron 2 pruebas con desviación significativa del equilibrio Hardy-Weigberg después de la corrección de Bonferroni (cuadro 18).

Estas desviaciones se presentaron en el área de VER para los locus Ced 131 ($H_o = 0.500$ y $H_e = 0.745$) y en el área de OAX se presentó una desviación en también el locus Ced 131 ($H_o = 0.286$ y $H_e = 0.759$).

Cuadro 18. Valores de la prueba de Chi-cuadrada para el equilibrio de Hardy-Weinberg.

Área	Locus	DF	ChiSq	Prob	Signif
VER	ced 2	45	94.958	0.019	ns
VER	ced 61	21	32.805	0.048	ns
VER	ced 131	15	36.457	0.002	*
TAB	ced 2	66	51.963	0.897	ns
TAB	ced 61	28	23.074	0.729	ns
TAB	ced 131	21	29.015	0.114	ns
OAX	ced 2	15	20.338	0.159	ns
OAX	ced 61	10	12.851	0.232	ns
OAX	ced 131	15	35.000	0.002	**
FMEX	ced 2	21	19.333	0.564	ns
FMEX	ced 61	15	11.333	0.729	ns
FMEX	ced 131	6	2.388	0.881	ns
CAMP	ced 2	21	22.500	0.371	ns
CAMP	ced 61	6	6.245	0.396	ns
CAMP	ced 131	15	18.000	0.263	ns
DESC	ced 2	21	10.667	0.969	ns
DESC	ced 61	10	7.665	0.661	ns
DESC	ced 131	3	8.678	0.034	ns

Después de la corrección de Bonferroni: * $P < 0.002$, ** $P < 0.0005$, *** $P < 0.00005$, *ns= no significativa

6.2.7 Equilibrio de ligamiento

Los resultados de la prueba de equilibrio de ligamiento no fueron significativos, se realizó la corrección de Bonferroni para pruebas de comparación múltiples. Por lo que hay independencia estadística entre los locus (cuadro 19).

Cuadro 19. Valores de la prueba de equilibrio de ligamiento por par de loci por área.

* Valores significativos $P < 0.0016$ usando la corrección de Bonferroni.

Par de loci	Área					
	VER	TAB	OAX	FMEX	CAMP	DESC
Ced2-Ced18	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Ced2-Ced41	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Ced18-Ced41	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Ced2-Ced61	0.40	0.30	0.48	0.81	0.79	0.36
Ced18-Ced61	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Ced41-Ced61	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Ced2-Ced131	0.033	0.32	0.17	0.81	0.92	0.10
Ced18-Ced131	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Ced41-Ced131	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Ced61-Ced131	0.10	0.044	0.21	0.28	0.58	0.23

6.2.8 Endogamia

Se estimaron estadísticos-F en cada locus para evaluar si las desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg están relacionadas con endogamia. Moderada diferenciación genética (F_{ST}) se encontró para todos los microsatélites. Se obtuvo un valor alto del coeficiente de consanguinidad (F_{IS}) en el locus Ced 131, de manera similar el coeficiente de endogamia total (F_{IT}) presentó un valor alto para el Ced 131.

Cuadro 20. Estadísticos-F de cada microsatélite para *C. odorata* de seis áreas de muestreo en el golfo y sureste de México

Locus	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
ced 2	-0.062	0.008	0.066
ced 61	0.019	0.086	0.069
ced 131	0.287	0.328	0.057

6.2.9 Estadístico F_{ST} total y flujo genético

La diferenciación genética se determinó mediante la estimación de F_{ST} total entre áreas, $F_{ST} = 0.032$, $p < 0.05$. Los valores de F_{ST} por pares de población se presentan en el Cuadro 21. La mayor diferenciación genética se observa en el área DESC, la cual presenta diferencias significativas en comparación con las áreas VER, TAB y OAX. También se observó diferenciación genética entre VER-OAX y VER-CAMP.

Cuadro 21. Comparaciones de los valores de F_{ST} de las áreas de muestro de *C. odorata*. Los valores marcados presentan diferencias significativas $P < 0.05$

	VER	TAB	OAX	FMEX	CAMP	DESC
VER	0.00000					
TAB	0.01647	0.00000				
OAX	0.02787	0.00734	0.00000			
FMEX	0.01715	-0.01497	-0.00328	0.00000		
CAMP	0.05502	0.00800	0.04973	0.02279	0.00000	
DESC	0.09160	0.05382	0.11351	0.02296	0.07953	0.0000

El número de migrantes por generación (N_m) calculados a partir de los valores de F_{ST} se muestran en el Cuadro 22. Los valores variaron desde 2.679 entre DESC-VER hasta un valor infinito entre FMEX-TAB y FMEX-OAX.

Cuadro 22. Número de migrantes por generación (N_m) entre las áreas de muestreo a partir de cinco microsatélites de *C. odorata*

	VER	TAB	OAX	FMEX	CAMP	DESC
VER	0					
TAB	19.942	0				
OAX	10.935	142.592	0			
FMEX	29.825	∞	∞	0		
CAMP	5.237	67.859	6.559	10.573	0	
DESC	2.679	4.844	2.162	14.312	3.408	0

6.2.10 Análisis de varianza molecular

EL análisis de varianza molecular (AMOVA) presentó diferencias significativas (cuadro 23), el cual indica que la mayor parte de la varianza genética está dentro de los individuos con un valor del 80% de la varianza total, el 17 % se encuentra entre individuos y tan solo el 3% entre las áreas probadas.

Cuadro 23. Análisis de varianza molecular de cinco microsatélites en 93 individuos de *C. odorata* $P < 0.05$.

Fuente de variación	df	SS	MS	Componente de varianza	% del total	F-Statistics	P
Entre poblaciones	5	12.327	2.465	0.039	3%	0.032	0.011
Entre individuos	87	121.662	1.398	0.207	17%	0.174	0.001
Dentro de individuos	93	91.500	0.984	0.984	80%	0.200	0.001

6.2.11 Análisis de agrupamiento de las seis áreas de muestreo

El análisis de agrupamiento de las seis áreas de muestreo se presenta en la Figura 28. En general, se observó que las áreas más similares entre si son FMEX y TAB. El análisis de agrupamiento de los individuos se presenta en la Figura 29.

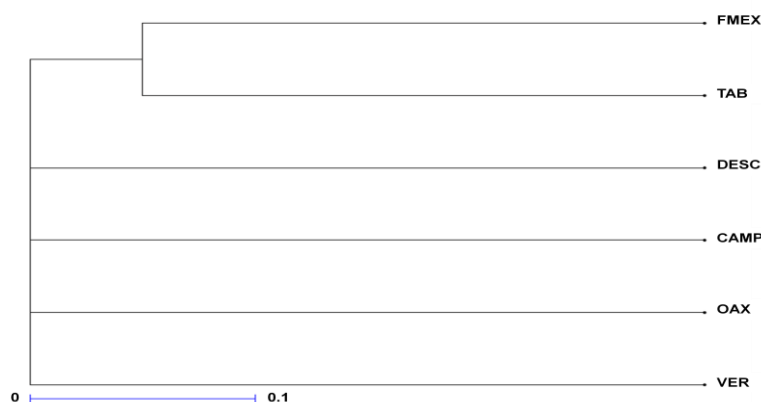


Figura 28. Dendrograma de las seis áreas de muestreo de *C. odorata* por el método Unweighted neighborjoining con el software Darwin 5.

En general, el análisis de clúster de los individuos indica la formación de cuatro conglomerados, sin embargo dentro de estos grupos se distribuyen individuos de las seis aéreas de muestreo sin ningún orden aparente respecto a su precedencia (figura 29).

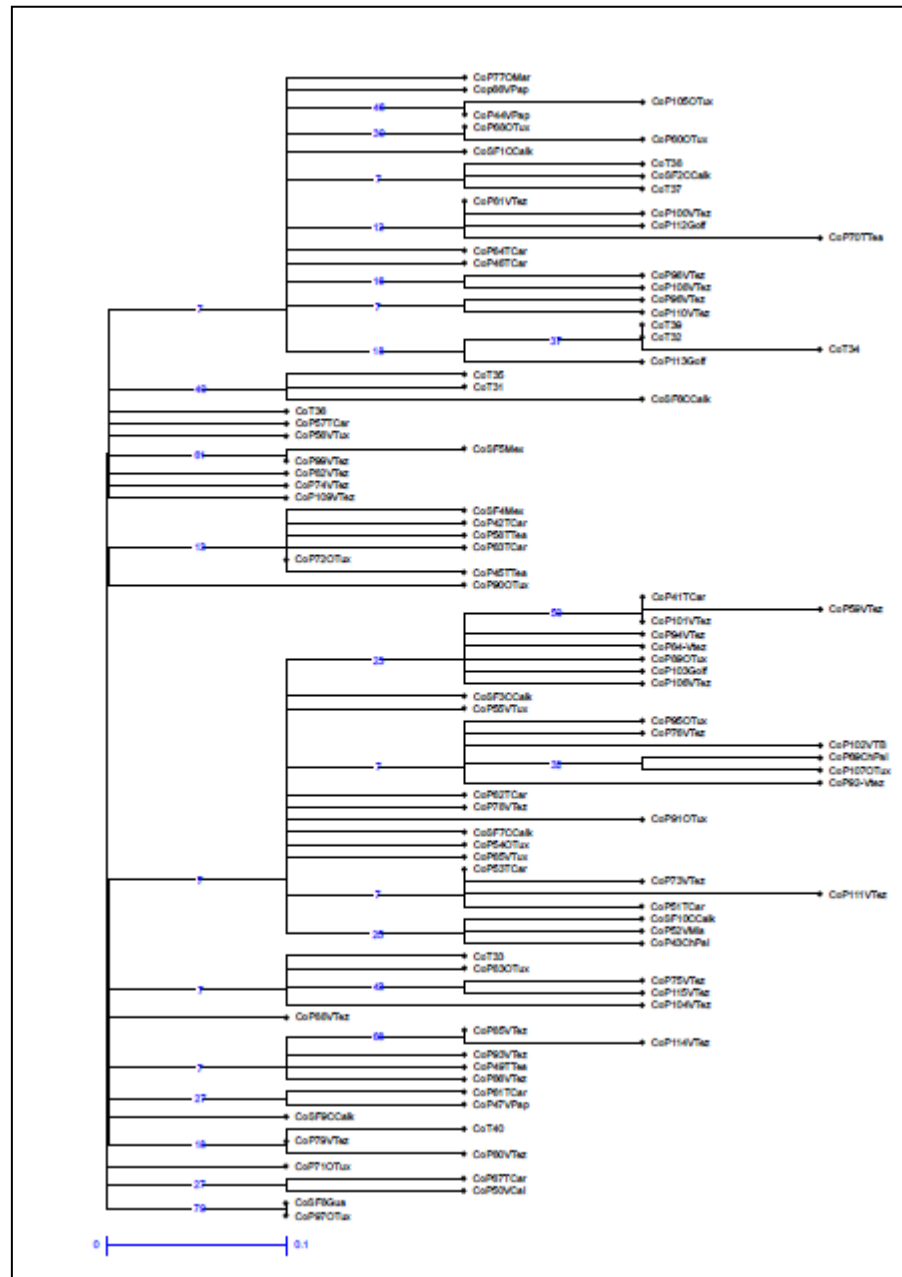


Figura 29. Dendrograma de 93 individuos de *C. odorata* por el método Unweighted neighborjoining con 10 000 repeticiones de bootstrap en el software Darwin 5.

6.2.12 Determinación del numero de poblaciones de *C. odorata*

El análisis de estructura realizado con los 93 individuos de *C. odorata* genotipificados a partir de cinco marcadores microsatélites mostró que el mayor valor de delta k se alcanzó con $k=2$ (figura 30), con lo cual se determinó una estructura poblacional de dos grupos para los individuos de *C. odorata* (figura 31).

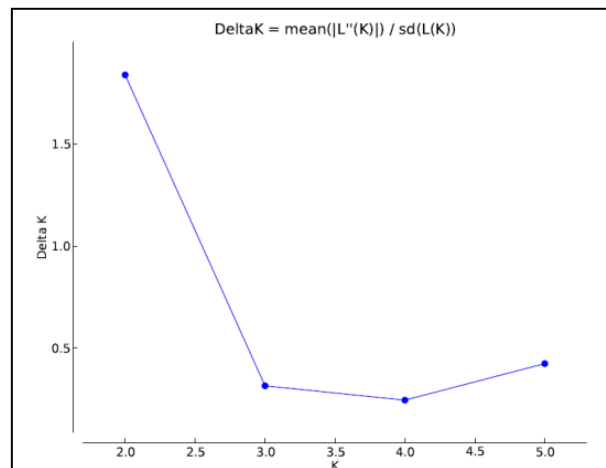


Figura 30. Número de poblaciones inferidas a partir de delta k mediante el programa Structure.

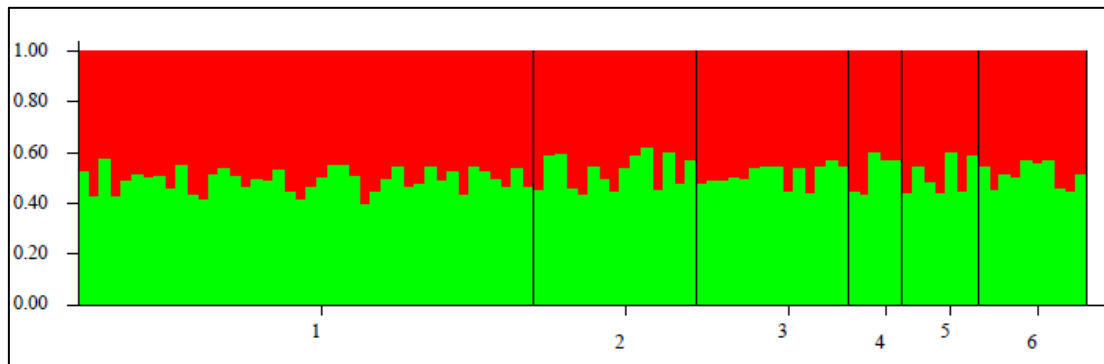


Figura 31. Estructura poblacional determinada a partir del programa Structure Harvester. Cada individuo está representado por una línea vertical. A partir de las frecuencias alélicas de cinco microsatélites de *C. odorata* en el sureste de México. 1: VER, 2: TAB, 3: OAX, 4: FMEX, 5: CAMP y 6: DESC.

6.3 Seguimiento de individuos de *C. odorata* en las diferentes plantaciones.

La relación de los individuos seleccionados para esta etapa se presenta en el Cuadro 24.

Cuadro 24. Relación de individuos seleccionados para el seguimiento de *C. odorata* en cuatro plantaciones del sureste de México

Mayor crecimiento		Menor crecimiento	
Individuo	Procedencia	Individuo	Procedencia
C2	Guatemala	C5	Frontera México-Guatemala
C23	Calakmul, Campeche	C41	Cárdenas, Tabasco
C58	Teapa, Tabasco	C52	Misantla, Veracruz
C82	Tezonapa, Veracruz	C64	Cárdenas, Tabasco
C45	Teapa, Tabasco	C103	Golfo
C95	Tuxtepec, Oaxaca	C115	Tezonapa, Veracruz

6.3.1 Análisis de fenoles

Los promedios de las concentraciones de fenoles totales de los 12 individuos analizados por plantación se presentan en la Figura 32.

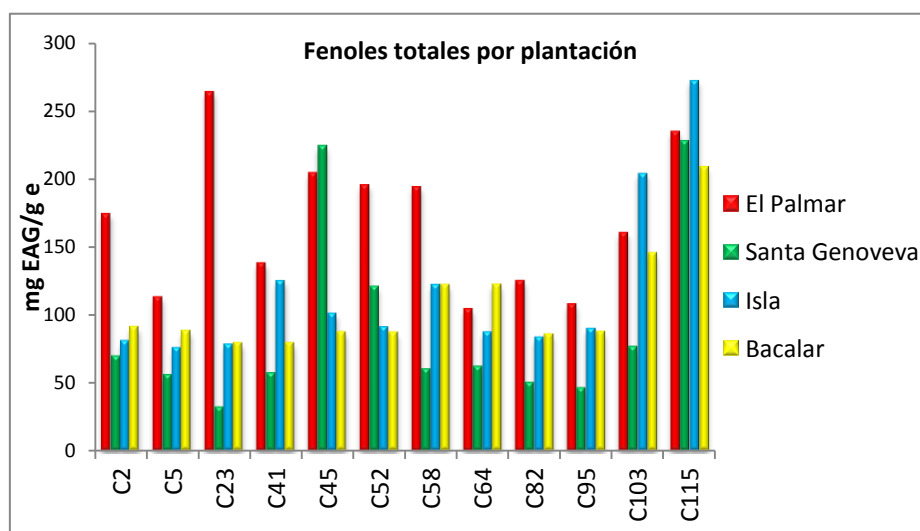


Figura 32. Concentración de fenoles totales de individuos de *C. odorata* en cuatro plantaciones del sureste de México.

Análisis de varianza global de fenoles de los individuos de las cuatro plantaciones.

En esta parte se consideraron a los 131 individuos (12 individuos con 2 o 3 repeticiones en las cuatro plantaciones) como una sola unidad para establecer diferencias entre plantaciones, individuos y bloques.

El análisis de varianza global indicó que hay diferencias significativas entre plantaciones e individuos (Tukey, $p \leq 0.05$), el efecto del bloques no es considerable (cuadro 25).

Cuadro 25. Análisis de varianza con diseño de bloques al azar del contenido fenólico de 131 individuos *C. odorata* de cuatro plantaciones forestales.

	suma de cuadrados	Gl	cuadrados medios	F	P
Intercepto	1112627	1	1112627	410.3607	0.000000
Plantación-Localidad	116504	3	38835	14.3230	0.000000
Individuos	218044	11	19822	7.3108	0.000000
Bloque	26200	4	6550	2.4157	0.052913
Error	303670	112	2711		

Con relación a las plantaciones en las diferentes localidades, El Palmar presenta la media más alta de concentración de fenoles con un valor medio de 170 mg EAG/g e, seguido por Isla, Bacalar, Genoveva, con valores de 119, 103 y 94 mg EAG/g e, respectivamente (Tukey, $p \leq 0.05$) (figura 33).

En el cuadro 26 se presenta la comparación de medias de la concentración de fenoles de individuos de *C. odorata* considerando de manera integral las cuatro plantaciones, este análisis indicó que el individuo 115 presentó las más altas concentraciones mientras que en el individuo 5 se observaron las menores concentraciones (Tukey, $p \leq 0.05$).

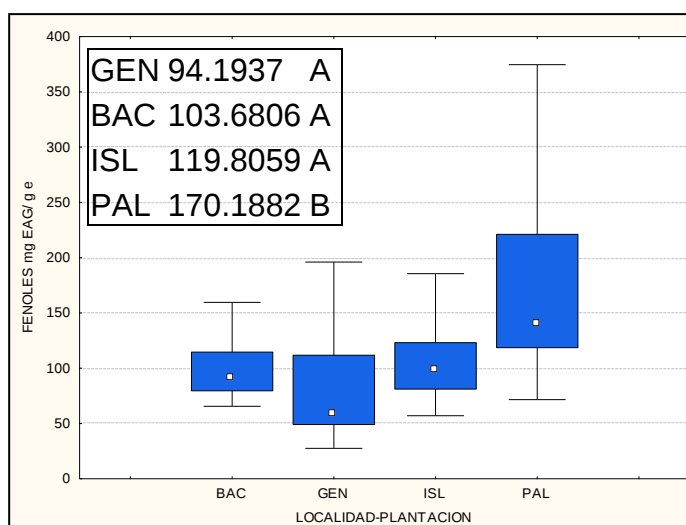


Figura 33. Concentración media de fenoles en cuatro plantaciones de *C. odorata*.

*BAC: Bacalar, GEN: Santa Genoveva, ISL: Isla, PAL: Palmar

Cuadro 26. Comparación de medias de la concentración de fenoles de individuos de *C. odorata* en las cuatro plantaciones de manera global.

Individuos	Fenoles mg EAG/ge	
5	80.6000	A
95	82.6455	A
82	86.4636	A B
64	94.4500	A B
41	100.0583	A B
2	106.1909	A B
23	121.0091	A B
52	123.7250	A B
58	130.6455	A B
103	153.0444	A B
45	160.3727	C
115	239.4182	D

Análisis de varianza de fenoles por plantación

El análisis de varianza de los individuos en cada una de las plantaciones muestra diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0.05$) en el contenido fenólico para Bacalar, Isla, Santa Genoveva, mientras que En El Palmar no hay diferencias (cuadro 27). La comparación de medias de cada plantación se presenta en el Cuadro 28.

Cuadro 27. Análisis de varianza de la concentración de fenoles para las cuatro plantaciones

Santa Genoveva					
	suma de cuadrados	gl	cuadrados medios	f	P
intercept	230843.2	1	230843.2	197.601	0.00
clones	84011.3	11	7637.4	6.5376	0.000443
bloque	16381.8	4	4095.4	3.5057	0.030819
error	18691.7	16	1168.2		
San Felipe Bacalar					
	suma de cuadrados	gl	cuadrados medios	f	P
intercept	124015.1	1	124015.1	206.1231	0.00
clones	37405.9	11	3400.5	5.652	0.001299
bloque	1816	4	454	0.7546	0.570469
error	9024.8	15	601.7		
Isla					
	suma de cuadrados	gl	cuadrados medios	f	P
intercept	245649.4	1	245649.4	540.6824	0.00
clon	112979.5	11	10270.9	22.6065	0.00
bloque	3026.4	3	1008.8	2.2204	0.118958
error	8632.3	19	454.3		
El palmar					
	suma de cuadrados	gl	cuadrados medios	f	P
intercept	919987	1	919987	144.6253	0.00
clon	87671.4	11	7970.1	1.2529	0.317853
bloque	1042	2	521	0.0819	0.921666
error	127223.6	20	6361.2		

Cuadro 28. Comparación de medias de la concentración de fenoles por individuo de *C. odorata* en cada una de las plantaciones.

Bacalar		Genoveva		Isla		El Palmar	
Individuo	Fenoles mg EAG/ g e	Individuo	Fenoles mg EAG/ g e	Individuo	Fenoles mg EAG/ g e	Individuo	Fenoles mg EAG/ g e
41	79.43 A	23	32.10 A	5	75.9333 A	64	104.6000 A
23	79.43 A	95	46.26 A	23	78.4333 A	95	108.2667 A
82	85.76 A	82	50.10 A	2	81.1000 A	5	113.3500 A
52	87.26 A	5	55.76 A	82	83.6000 A	82	125.4333 A
45	87.35 A	41	57.26 A	64	87.4333 A	41	138.2667 A
95	87.60 A	58	60.10 A	95	90.1000 A	103	160.8500 A
5	88.26 A	64	61.85 A	52	91.1000 A	2	174.6000 A
2	91.10 A	2	69.60 A	45	101.100 A	58	194.4333 A
58	122.1 A	103	76.60 A	58	122.433 A	52	195.9333 A
64	122.3 B	52	120.6 B	41	125.266 A	45	204.7667 A
103	145.3 B	45	223.9 C	103	203.933 B	115	235.2667 A
115	214.3 C	115	227.4 D	115	272.266C	23	264.4333 A

La concentración media de fenoles más alta se observó en El Palmar y Bacalar, seguido por Genoveva e Isla, en estas plantaciones se observó de manera constante al individuo C115 con las más altas concentraciones, el valor máximo fue de 272 mg EAG/ g e en Isla. En El palmar el individuo C115 es la segunda concentración más alta con una valor de 230 mg EAG/ g e. Los individuos con las concentraciones más bajas varían de acuerdo a la plantación siendo el individuo C23 uno de los que presenta la concentración más baja en las plantaciones de Bacalar (79 mg EAG/ g e), Santa Genoveva (32 mg EAG/ g e) y en Isla (78 mg EAG/ g e), contrastantemente este individuo presenta altas concentraciones de fenoles en El Palmar con un valor de 264 mg EAG/ g e (Cuadro 28).

6.3.2 Análisis de limonoides

Los promedios de las concentraciones de limonoides de los 12 individuos analizados por plantación se presentan en la Figura 34.

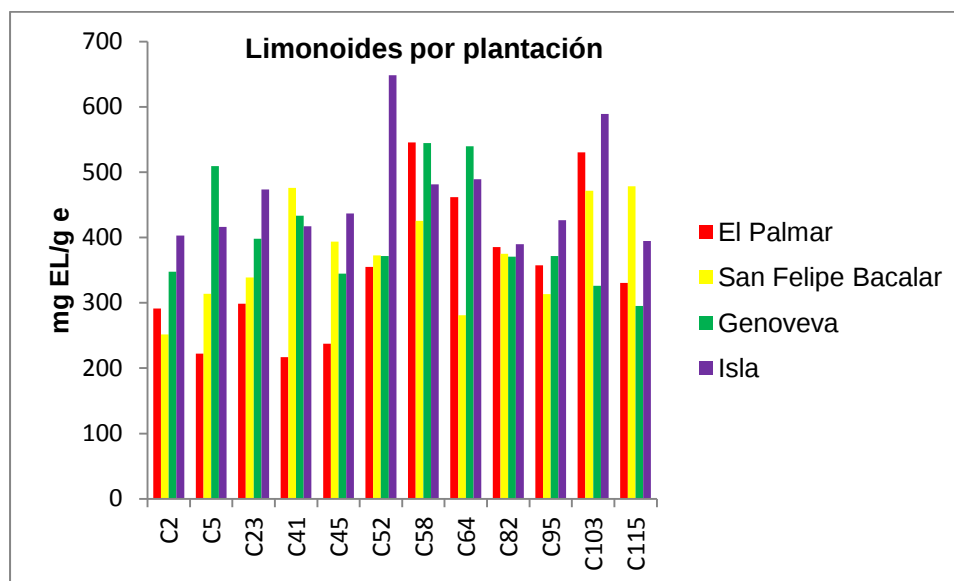


Figura 34. Concentración media de limonoides de individuos de *C. odorata* en las cuatro plantaciones.

Análisis de varianza global de limonoides de las cuatro plantaciones

El análisis de varianza global de la concentración de limonoides indica que hay diferencias entre plantaciones e individuos, entre bloques no se presentaron diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0.05$) (cuadro 29).

Cuadro 29. Análisis de varianza con diseño de bloques al azar de la concentración de limonoides de 131 individuos de *C. odorata* de 4 plantaciones forestales.

	Suma de cuadrados	gl	Cuadrados medios	F	P
Intercept	6453838	1	6453838	419.4153	0.000000
Plantación-Localidad	364538	3	121513	7.8967	0.000080
Individuos	531120	12	44260	2.8763	0.001719
Bloque	80167	4	20042	1.3025	0.273490
Error	1723423	112	15388		

En general, tomando en cuenta las cuatro plantaciones de manera integral, las mayores concentraciones de limonoides se alcanzan en la plantación de Isla con un promedio de 467 mg EL/ g e, seguido por Santa Genoveva con un valor de 398 mg EL/ g e, y por último las plantaciones de Bacalar y El Palmar sin diferencias significativas entre ellas, con concentraciones de 343 y 340 mg EL/ g e respectivamente. (Tukey, $p \leq 0.05$) (cuadro 30).

Cuadro 30. Comparación de medias de la Concentración de limonoides por plantaciones de *C. odorata*.

Plantación-Localidad Limonoides mg EL/g e		
PALMAR	340.1667	A
BACALAR	343.0914	A
GENOVEVA	398.4244	B
ISLA	467.7451	C

El análisis integral de la comparación de medias de la concentración de limonoides por individuos en las cuatro plantaciones indica que el individuo C58 presentó las más altas concentraciones de limonoides con una concentración media de 495 mg EL/ g e, mientras que en el individuo C45 se observaron las menores concentraciones con un promedio de 292 mg EL/ g e (Tukey, $p \leq 0.05$) (cuadro 31)

Cuadro 31. Comparación de medias de la concentración de limonoides de individuos de *C. odorata* en las cuatro plantaciones de manera global.

Individuo Limonoides mg EL/g e		
45	292.1968	A
2	293.2576	A
46	308.7500	B
23	344.6212	C
95	372.0455	C
115	373.1439	C
5	378.4091	C
82	379.2045	C
41	385.7986	C
52	436.8750	C
64	438.3333	C
103	491.5278	D
58	495.0000	D

Análisis de varianza de limonoides por plantación

El análisis de varianza por separado de los individuos en cada una de las plantaciones muestra diferencias significativas en la concentración de limonoides para Genoveva, El Palmar; mientras que en Isla y Bacalar no se presentan diferencias (Tukey, $p \leq 0.05$) (cuadro 32). La mayor concentración de limonoides la alcanzó el individuo C58 de Genoveva con un valor de 544 mg EL/g e, las menores concentraciones se observaron en el individuo C115 con un valor de 295 mg EL/g e y en el individuo C45 con un valor de 158 mg EL/g, de Genoveva y El Palmar respectivamente (cuadro 33).

Cuadro 32. Análisis de varianza de la concentración de limonoides para las cuatro plantaciones de *C. odorata*

Bacalar					
	suma de cuadrados	gl	cuadrados medios	F	P
intercept	1045646	1	1045646	36.09113	0.000061
clon	246135	11	22376	0.77232	0.662108
bloque	139330	5	27866	0.96181	0.478069
error	347668	12	28972		
Santa Genoveva					
	suma de cuadrados	gl	cuadrados medios	F	P
intercept	3865971	1	3865971	837.7703	0.000000
clon	214013	11	19456	4.2161	0.003477
bloque	35195	4	8799	1.9067	0.153060
error	83063	18	4615		
Isla					
	suma de cuadrados	gl	cuadrados medios	F	P
intercept	3642574	1	3642574	460.3314	0.000000
clon	194157	11	17651	2.2306	0.060097
bloque	618	3	206	0.0260	0.994133
error	150346	19	7913		
El Palmar					
	suma de cuadrados	gl	cuadrados medios	F	P
intercept	3826747	1	3826747	442.8644	0.000000
clon	411393	11	37399	4.3282	0.002230
bloque	6746	2	3373	0.3903	0.681868
error	172818	20	8641		

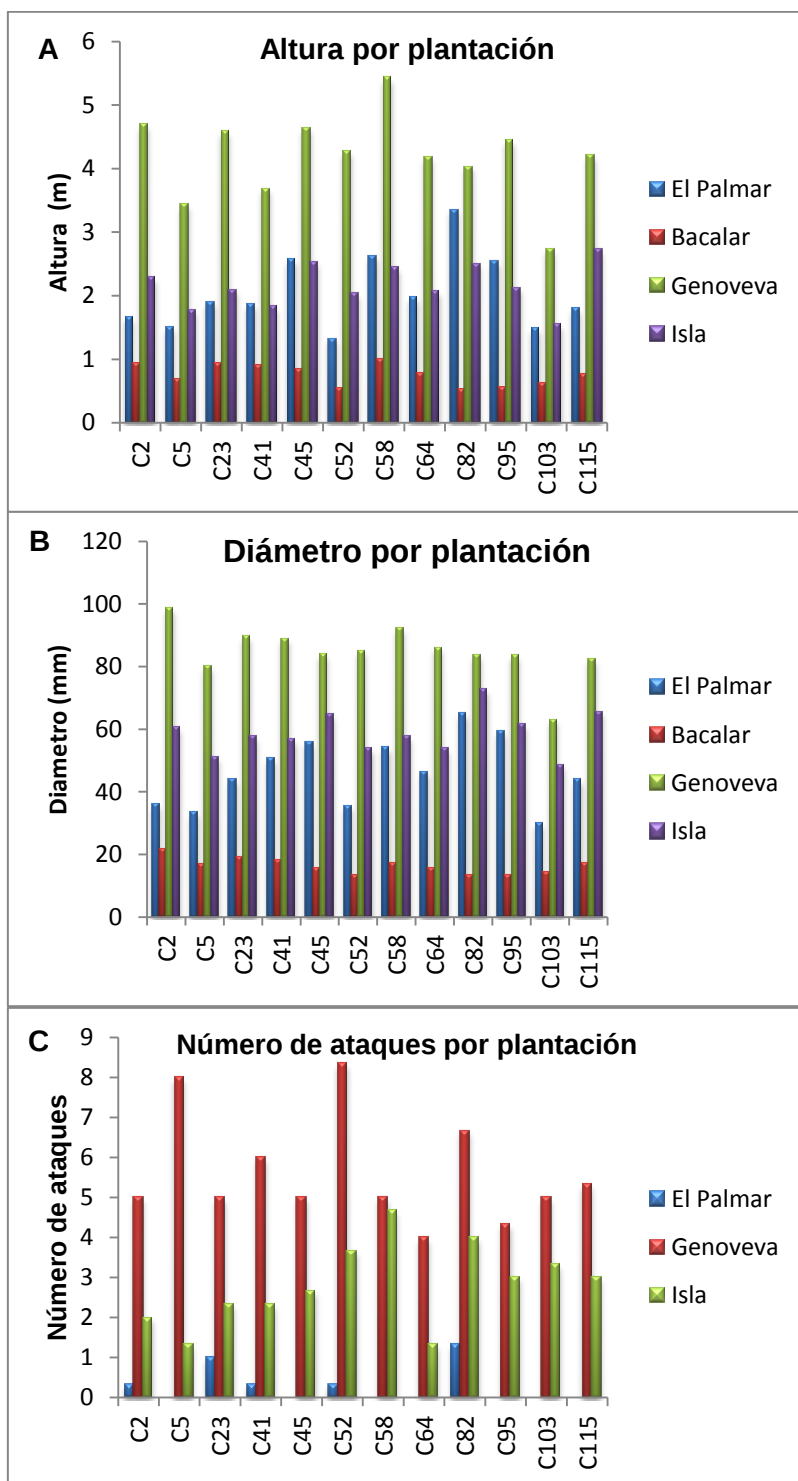
Cuadro 33. Comparación de medias de la concentración de limonoides por individuos de *C. odorata* en cada una de las plantaciones

Genoveva		El Palmar		Bacalar		Isla	
Individuo	Limonoides mg EL/ g e	Individuo	Limonoides mg EL/ g e	Individuo	Limonoides mg EL/ g e	Individuo	Limonoides mg EL/ g e
115	295.2778 A	45	158.3333 A	2	251.4583 A	82	389.5833 A
103	326.2500 B	41	216.8056 A	64	281.0417 A	115	394.8611 A
45	344.8606 C	5	222.2917 B	95	313.3333 A	2	403.1250 A
2	347.7778 C	2	291.1111C	5	313.7500 A	5	416.2500 A
82	370.4167 D	23	298.889 C	23	338.7500 A	41	417.0833 A
52	371.3889 D	115	330.6944C	52	372.7778 A	95	426.2500 A
95	371.5278 D	52	354.861 C	82	375.0000 A	45	436.9444 A
23	398.120 D	95	357.500 C	45	393.750 A	23	473.4722 A
41	433.4722 D	82	385.2778C	58	425.2778 A	58	481.1111 A
5	509.3056 E	64	424.861 C	103	471.4583 A	64	489.0278 A
64	539.7917 E	103	530.416 D	41	475.8333 A	103	589.1667 A
58	544.5833 F	58	545.5556 E	115	478.1944 A	52	648.4722 A

6.3.3 Variables registradas en las cuatro plantaciones

Los datos de altura, diámetro, número ataques, número de ramas, rectitud del árbol y recuperación después del ataque, de los 12 individuos por plantación se presentan en la Figura 35.

En general, se observó que la plantación que alcanzó mayor altura fue Santa Genoveva con árboles de hasta 5 m, seguido por las plantación de Isla con árboles de casi 3 m, después El Palmar con árboles 2.5 m y por último Bacalar con árboles de menos de 1 m de altura (figura 35A). La plantación de San Felipe Bacalar no se considero para la medición de las demás variables pues el bajo crecimiento dificultó su medición. Para el diámetro y el número de ataques las tendencias son las mismas, con mayor diámetro y mayor ataque en Santa Genoveva, seguido por Isla y por último El Palmar (figura 35B y 35C). Respecto al número de ramas los mayores valores se alcanzaron para la plantación de Isla, seguido por Santa Genoveva y por último El Palmar con árboles con menor número de ramas (figura 35D). La mejor rectitud y recuperación se presentó en los árboles de la plantación de Santa Genoveva (figura 35E y 35F).



Continuación...

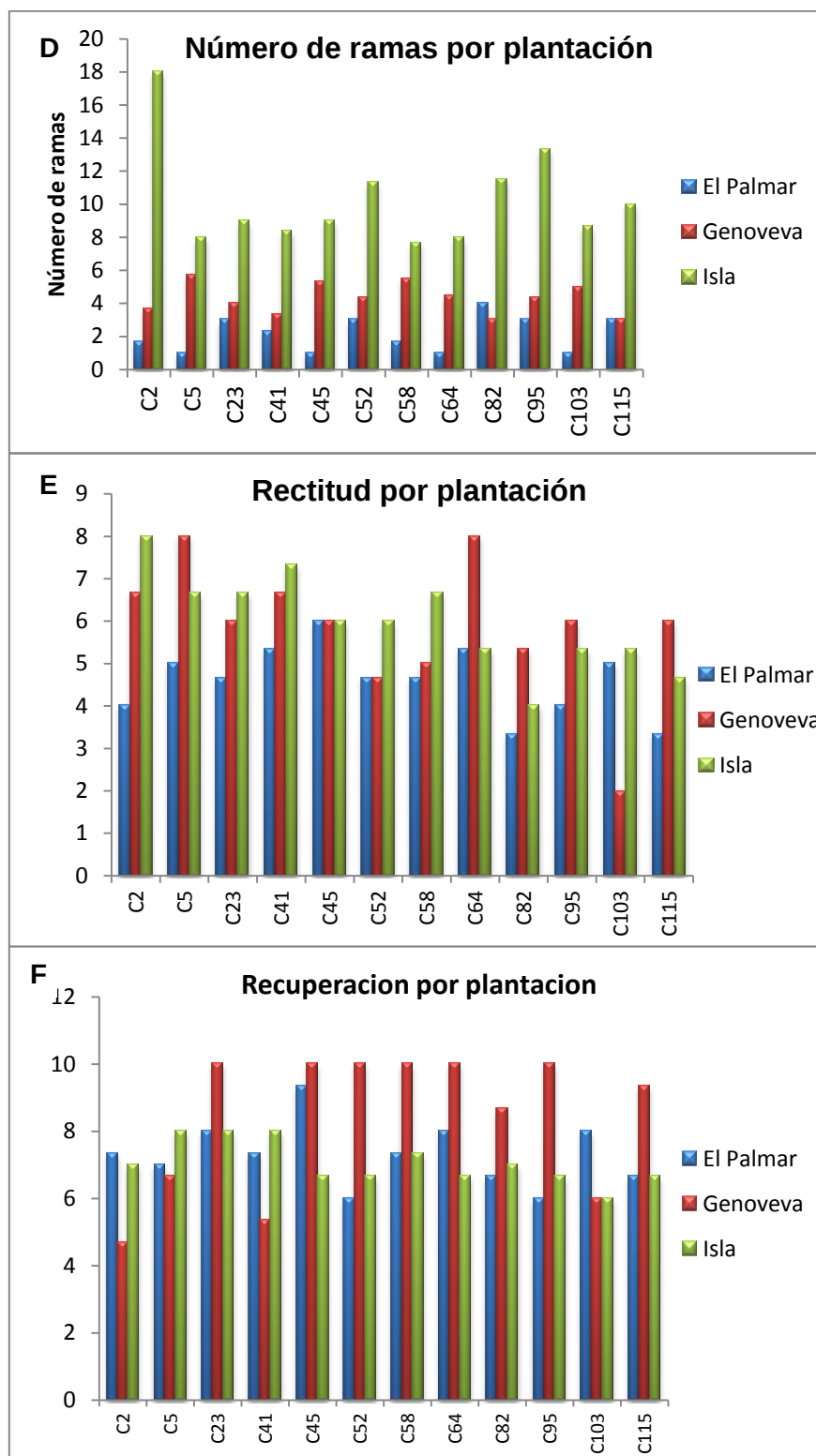


Figura 35. Respuesta de los 12 individuos de *C. odorata* en las diferentes plantaciones. Variables consideradas: altura, diámetro de la base, número de ataques, número de ramas, rectitud y recuperación.

6.3.4 Correlación entre variables

Las correlaciones de Pearson ($p < .05$) y de Spearman ($p < .05$) se presentan en el Cuadro 34 y 35.

Cuadro 34. Correlaciones entre variables cuantitativas evaluadas en *C. odorata* (Pearson $p < .05$)

	Fenoles	Limonoides	Altura	Diámetro	No. ataques	No. ramas
Fenoles	1.00	-0.28	-0.33	-0.45	-0.40	-0.22
Limonoides	-0.28	1.00	0.03	0.09	0.20	0.37
Altura	-0.33	0.03	1.00	0.94	0.72	-0.13
Diámetro	-0.45	0.09	0.94	1.00	0.81	0.09
Ataques	-0.40	0.20	0.72	0.81	1.00	0.19
Ramas	-0.22	0.37	-0.13	0.09	0.19	1.00

Cuadro 35. Correlaciones entre variables cualitativas evaluadas en *C. odorata* (Spearman $p < .05$)

	Rectitud	Recuperación	Poda	Insecticida
Fenoles	-0.42	-0.06	-0.53	-0.02
Limonoides	0.34	-0.03	0.38	0.44
Altura	0.20	0.30	0.48	-0.32
Diámetro	0.31	0.21	0.66	-0.13
No. ataques	0.35	0.14	0.81	0.008
No. ramas	0.33	-0.17	0.77	0.81
Rectitud	1.00	0.21	0.54	0.28
Recuperación	0.21	1.00	0.08	-0.22
Poda	0.54	0.083	1.00	0.50
Insecticida	0.28	-0.22	0.50	1.00

Para el análisis canónico se dividió a las variables en 3 grupos (3 variables canónicas): 1) variables fitoquímicas: fenoles y limonoides, 2) variables de crecimiento: altura y diámetro, 3) variables relacionadas al ataque: número de ataques y número de ramas. En esta agrupación no se incluyeron las variables de rectitud y recuperación por afectar la significancia del análisis. Sin embargo se realizó

otro análisis canónico para incluirlas, quedando los grupos de la siguiente manera, (dos variables canónicas): 1) variables de crecimiento: altura y diámetro, 2) variables relacionadas al ataque: número de ataques, número de ramas, rectitud y recuperación, en este caso las variables fitoquímicas se excluyeron. Los resultados del coeficiente de correlación canónica (Rc) entre las nuevas variables canónicas se muestran en el Cuadro 36 y Cuadro 37.

Cuadro 36. Análisis de correlación No. 1

	Variables canónica 2 (variables de crecimiento)	Variable canónica 3 (variables de ataque)
Variable canónica 1 (variables Fitoquímicas)	Rc= 0.50 p= 0.04198	Rc=0.48 p= 0.033

Cuadro 37. Análisis de correlación canónica No.2

	Variables canónica 2 (variables de ataque)
Variable canónica 1 (variables de crecimiento)	Rc= .8331763 p= 0.000

Se realizó un análisis de componentes principales (figura 36) a las variables de estudio para ampliar el conocimiento sobre su interacción y similitud.

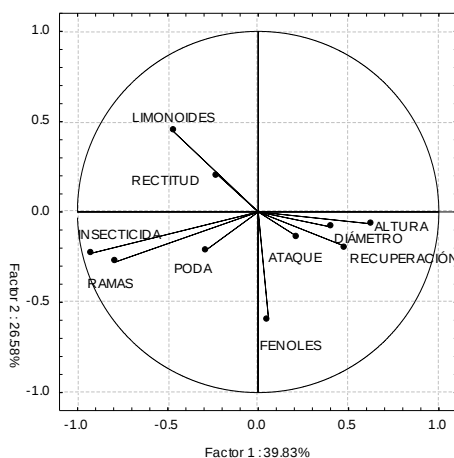


Figura 36. Análisis de componentes principales de 10 variables en *Cedrela odorata*.

Los análisis anteriores sugieren, en cierta medida, asociación entre las variables estudiadas. Los fenoles presentaron correlaciones negativas, la más alta correlación con la poda ($r = -0.53$), seguida con el diámetro ($r = -0.45$), después la asociación con la rectitud ($r = -0.45$) y la altura ($r = -0.40$), por último una asociación con la altura de $r = -0.33$ (cuadro 34 y 35). Los limonoides presentaron una correlación positiva, la más alta con la aplicación de insecticida ($r = 0.44$), seguida con la poda ($r = 0.38$), por último las asociaciones con el número de ramas y la rectitud, $r = 0.37$ y $r = 0.34$ respectivamente. De manera similar, estas asociaciones son evidentes en la proyección de las variables en el análisis de componentes principales donde se muestra su grado similitud o agrupamiento

6.3.5 Análisis de agrupamiento de los individuos de *C. odorata* de las tres plantaciones.

El análisis de agrupamiento de los 12 individuos de *C. odorata* en las tres plantaciones de manera global se presenta en la Figura 37, donde se observa evidente el efecto que ejercieron las características del sitio de plantación y las condiciones de manejo, pues los individuos se agrupan por plantación. En el análisis de clúster se obtuvieron dos grupos principales, un grupo formado exclusivamente por individuos de Santa Genoveva pues estos individuos destacan por presentar a los individuos con mayor altura y recuperación al ataque del barrenador; en el otro grupo se observó la formación de dos subgrupos que pertenecen a la plantación de El Palmar y la de Isla, en este ultimo subgrupo, conformado por los individuos de Isla, se les agregan los individuos C82 y C95 establecidos en El Palmar y el individuo C103 de Santa Genoveva. De la misma manera, en el análisis de componentes principales se observó la formación de 3 grupos claramente diferenciados por la localidad de la plantación (figura 38).

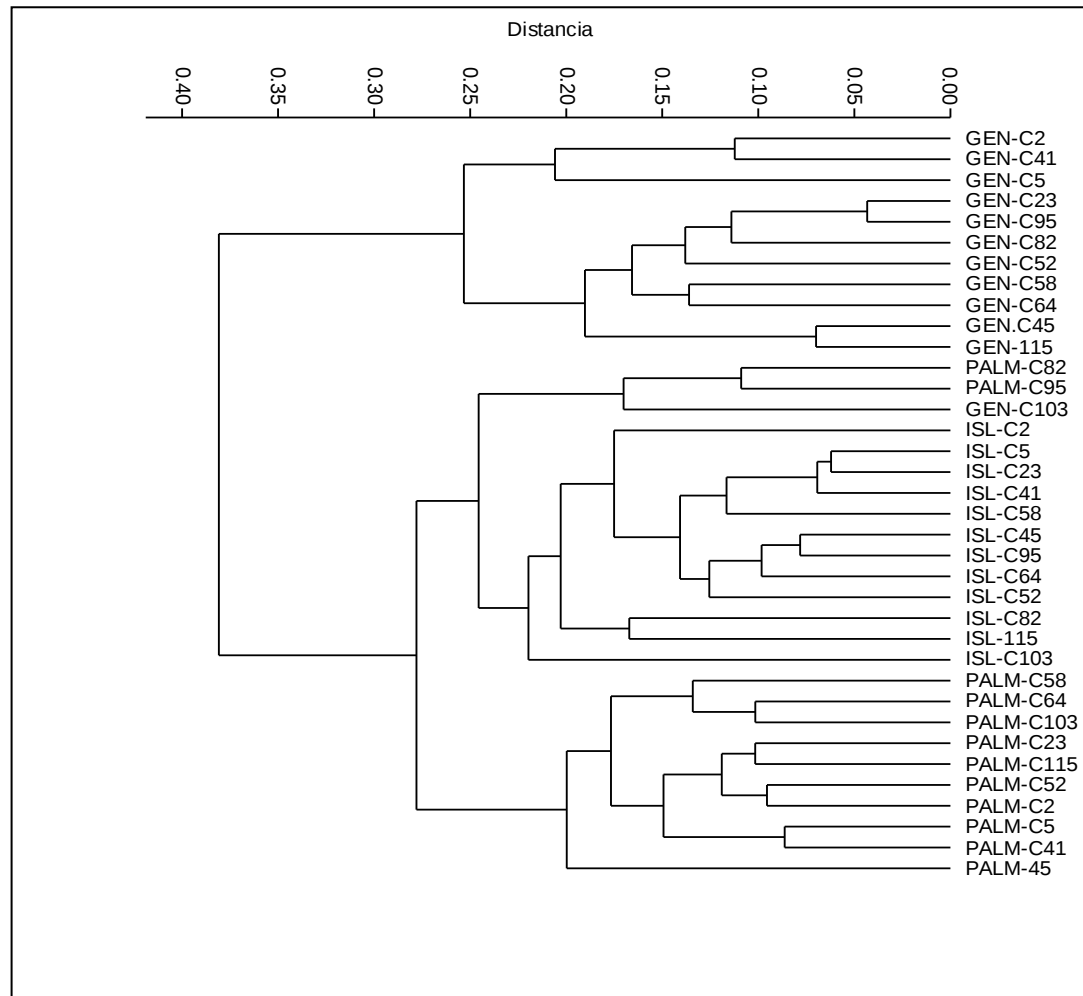


Figura 37. Agrupamiento de 36 individuos de *C. odorata* de tres plantaciones en base a 8 descriptores: fenoles, limonoides, altura, diámetro, número de ataques, número de ramas, rectitud y recuperación. Usando el logaritmo UPGMA y la distancia de Gower.

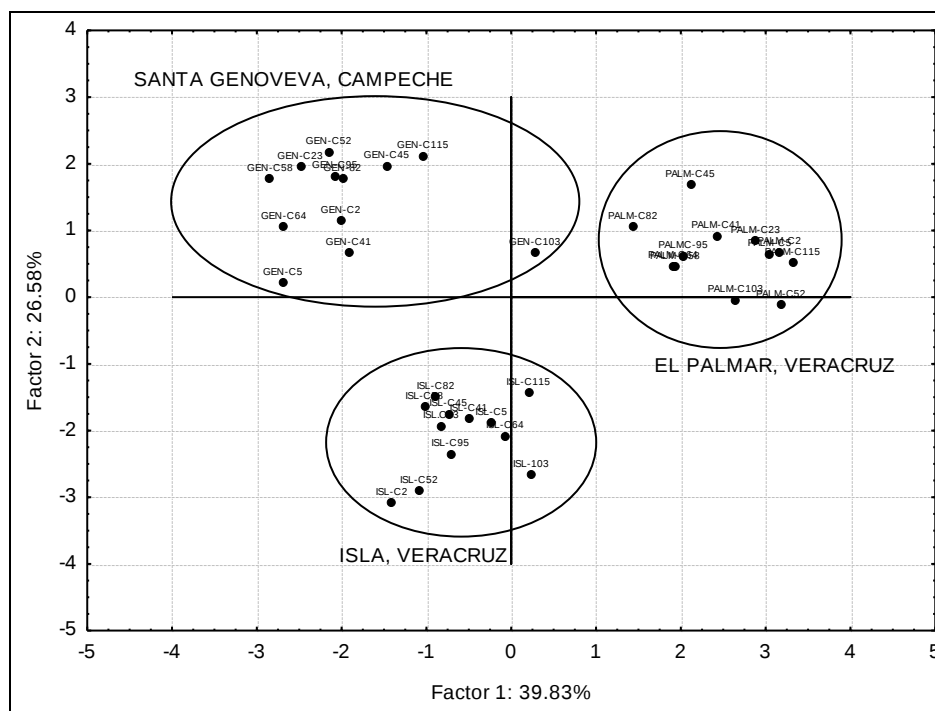


Figura 38. Análisis de componentes principales de 36 individuos de *C. odorata* de tres plantaciones en base a 8 descriptores: fenoles, limonoides, altura, diámetro, número de ataques, número de ramas, rectitud y recuperación.

En el análisis de clúster de cada plantación se observa una agrupación diferente para cada localidad (figura 39). En Santa Genoveva se observó la formación de 4 grupos, quedando fuera el individuo 103; los grupos son los siguientes, grupo 1: C5, C2 y C41; grupo 2: C115 y C45; grupo 3: C82 y C52; grupo 4: C58, C64, 95 y 23 (figura 40A). En Isla los grupos son los siguientes, grupo 1: C82 y C115; grupo 2: C5, C23, C41, C58; grupo 3: C45, C95, C64, C52 y C2; en Isla también se quedó fuera del agrupamiento el individuo C103 (Figura 40B). Por último, en El Palmar, grupo 1: C52, C2, C115 y C23; grupo 2: C64, C103, C5 Y C41; grupo 3: C58, C95 y C45 (figura 40C).

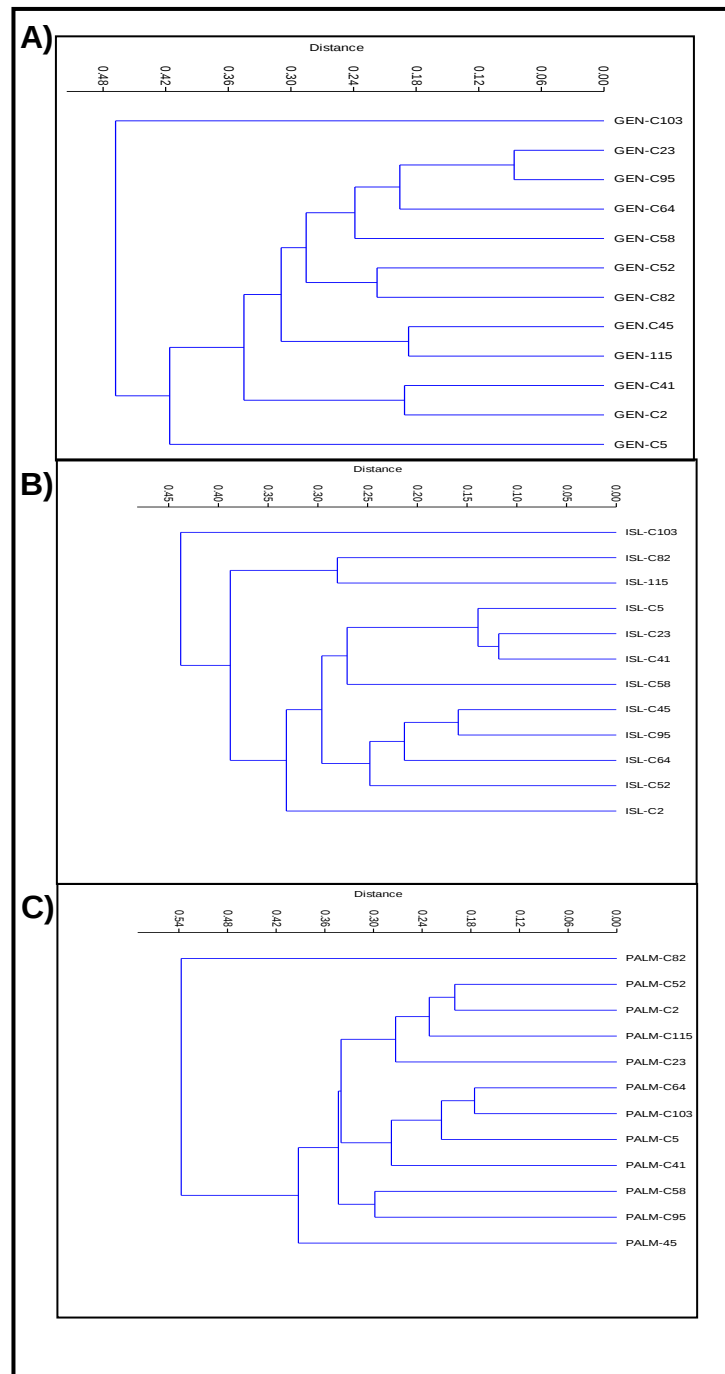


Figura 39. Agrupamiento de 12 individuos de *C. odorata* de por plantación, en base a 8 descriptores: fenoles, limonoides, altura, diámetro, número de ataques, número de ramas, rectitud y recuperación. Usando el logaritmo UPGMA y la distancia de Gower. A: Santa Genoveva, B: Isla, C: El Palmar.

6.4 Selección de individuos para su conservación y mejoramiento

De acuerdo a los resultados anteriores, tomando en cuenta la caracterización fitoquímica y molecular, los individuos recomendados para seguir con las acciones de mejoramiento genético y la conservación ex situ de la diversidad genética de *C. odorata* fueron C115, C58, C45, C103, C45 y C64 (cuadro 38). Las razones por las cuales se recomiendan estos individuos se abordan en el apartado de discusión.

Cuadro 38. Relación de individuos seleccionados para el mejoramiento genético y la conservación ex situ de la diversidad genética de *C. odorata*

Individuos seleccionados
C115 VER
C103 VER
C58 TAB
C64 TAB
C45 TAB

7 DISCUSIÓN

7.1 Variabilidad fitoquímica

Los árboles de *C. odorata* evaluados resultaron ampliamente variables en cuanto a sus concentraciones de fenoles y limonoides observándose diferencias marcadas entre individuos y procedencias. Los individuos de la procedencia Calakmul, Campeche presentaron los valores más altos de fenoles totales, flavonoides y proantocianidinas, pero menor concentración de limonoides. Por otro lado, las concentraciones más bajas de fenoles se obtuvieron en las procedencias de Tuxtepec, Oaxaca y Papantla, Veracruz. En cuanto a las concentraciones más elevadas de limonoides se obtuvieron en las procedencias de Cárdenas, Tabasco y Teapa, Tabasco. Estas diferencias se observan en el análisis de agrupamiento (figura 17), con la formación de tres grupos claramente diferenciados en cuanto a la concentración de los fenoles y limonoides. El primer grupo está formado por los individuos de Calakmul, Campeche y los individuos de la Frontera México-Guatemala, estos individuos tienen la característica de presentar altas concentraciones de fenoles y bajas en limonoides. El segundo grupo está formado por los individuos de Papantla, Veracruz, Tuxtepec, Oaxaca y Tuxtla, Veracruz, los cuales presentan las concentraciones más bajas de fenoles. Finalmente, el tercer grupo está conformado por los individuos de Teapa, Tabasco y Cárdenas, Veracruz caracterizados por altas concentraciones de limonoides. La asociación ($r^2 = 0.7$) que se observa entre los fenoles, flavonoides y proantocianidinas se debe a que los flavonoides son un grupo importante y numeroso dentro de los compuestos fenólicos y a la vez, las proantocianidinas pertenecen al grupo de los flavonoides (flavanoles) por lo cual están relacionados de manera proporcional. Se observa que los individuos que producen mayor concentración de fenoles producen una menor concentración de limonoides, sin embargo, dicha asociación no es estadísticamente significativa ($r^2 = 0.30$). En este sentido, se ha documentado que los fenoles están directamente involucrados en la resistencia a insectos en muchas plantas (Harborne, 2001). Ramputh *et al.* (1999) encontraron una relación directa entre la alta concentración de fenoles en el grano de diferentes genotipos de sorgo y la resistencia al ataque de

Sitophilus oryzae (Coleoptera: Curculionidae), en este estudio se propuso al contenido fenólico como un indicador de resistencia. Lo anterior sugiere que los individuos que forman al grupo uno pueden llegar a presentar una mejor defensa frente al ataque de *H. grandella*. Por otro lado, los limonoides de la familia Meliaceae han sido estudiados por sus propiedades insecticidas (Champagne *et al.*, 1992), como el estudio de Kipassa *et al.* (2008), quienes hacen referencia a los limonoides de la corteza del tallo de *C. odorata* y la capacidad anti-alimentaria en *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). De esta forma, los individuos del grupo tres resultan interesantes como fuente de limonoides para la investigación de sus propiedades insecticidas.

Los perfiles cromatográficos de los compuestos fenólicos de los individuos de *C. odorata* mostraron semejanza con respecto a la presencia y/o ausencia de los compuestos de acuerdo a sus cromatogramas, el análisis de clúster indica la presencia de tres grupos (figura 21): un grupo integrado por los individuos de Papantla, Tuxtepec, y Tuxtla, separado completamente de los dos siguientes grupos: un grupo formado por los individuos de Calakmul y Frontera México-Guatemala, y el otro por los individuos de Cárdenas y Teapa. Estos grupos coinciden con el análisis de agrupamiento evaluado en el punto anterior, lo que sugiere que las diferencias en concentración pudieran estar relacionadas con la presencia o ausencia de algunos compuestos fenólicos en los individuos analizados. En este aspecto, Macías-Sámano (2001) señala que mediante programas de mejoramiento genético se podrían ensayar individuos de *C. odorata* de diferentes procedencias para la búsqueda de compuestos de interés. El compuesto fenólico mayoritario y presente en todas las muestras analizadas, se infiere que corresponde a un flavonol de tipo glicósido de kaempferol, por el espectro de UV (λ máx 265 y 350nm), comparando con el espectro que reportan Campos & Markham (2007). Compuestos de este tipo han sido identificado anteriormente en *C. odorata* (Pérez-Flores *et al.*, 2012). De igual forma, en hojas de *Cedrela sinensis* (Meliaceae) se ha encontrado un glicósido de kaempferol con actividad antioxidante importante (Lee *et al.*, 2006). Se identificó también el flavanol catequina, tanto por comparación del tiempo de retención con el estándar (13.9min), como por el espectro de UV (λ máx 278nm),

aunque en algunos individuos está presente en una concentración muy baja. La catequina es un precursor de las proantocianidinas o taninos condensados, en los individuos de procedencias Calakmul C8-1 y Frontera México-Guatemala C1-19 se obtuvieron altas concentraciones de proantocianidinas, por lo que puede inferirse que sea alto el contenido de catequina en estos individuos. En este sentido, De Paula *et al.* (1997) reportaron al flavanol catequina como el posible responsable de la resistencia al barrenador *H. grandella* que se translocó de *T. cilata* (Meliaceae) a *C. odorata* por injerto, sin embargo en el presente estudio se identificó el flavanol catequina en hojas de *C. odorata*, tanto de forma monomérica identificada por HPLC, como también por la evaluación cuantitativa de proantocianidinas, las cuales están formadas por unidades de catequina y otros flavan-3-oles, (Rosales *et al.*, (2012). Mediante CG-MS se identificaron los sesquiterpenos β -elemeno, E-cariofileno, aromadendreno, humuleno, gama cadineno y D-germacreno, y los poli terpenos Di- α -Tocoferol y β -sitosterol. Los sesquiterpenos identificados en las hojas de *C. odorata* en este estudio han sido reportados en aceite esencial de hojas y tallo para esta misma especie (Maia *et al.* 2000; Villanueva *et al.* 2009). Por el contrario, no se encontraron evidencias de la presencia de triterpenoides del tipo Mexicanoide en las muestras analizadas, tales como gedunina o azadiractina, que han sido reportadas para especies de *Cedrela* spp. (Céspedes *et al.*, 2000).

Lo anterior sugiere que la composición de los metabolitos secundarios evaluados en *C. odorata* en esta parte de la investigación tienen características propias de acuerdo a la procedencia. Esto coincide con lo reportado para otras especies de Meliaceae, como es el caso del neem (*Azadirachta indica*), por ejemplo, Shidu *et al.* (2003) analizó 43 procedencias de la India, donde el contenido de azadiractina (limonoide) en el neem fue examinada para determinar la variabilidad entre procedencias y encontraron diferencias significativas entre procedencias de una misma región agroclimática y concluye que factores climáticos como la lluvia, la humedad o la temperatura no influyeron en el contenido de azadiractina en los árboles de neem. Por otro lado, la variabilidad detectada en el contenido de los fenoles y limonoides foliares en los individuos de la diferentes procedencias de este estudio, coinciden con la variación encontrada en diversas características de *C.*

odorata. En este sentido, Newton *et al.* (1999) encontró que el contenido de total de taninos y proantocianidinas varía significativamente de acuerdo a su procedencia en árboles de *C. odorata* de diferentes localidades de Costa Rica. Del mismo modo, Sánchez *et al.* (2003) encontraron variación en cuanto a parámetros de crecimiento en *C. odorata* de diferentes procedencias del sureste de México. Así mismo, hay evidencia en los ensayos de progenie y procedencia que indican que algunos genotipos muestran diferentes niveles de tolerancia al ataque del barrenador (Newton *et al.*, 1993b, Newton *et al.*, 1995; Newton *et al.*, 1999).

7.2 Variabilidad molecular

En el presente estudio se evaluaron cinco loci microsatélites fluorescentes en 93 individuos de *C. odorata* (Ced 2, Ced 18, Ced 41, Ced 61 y Ced 131), cuya metodología es más informativa y precisa en el tamaño y número de alelos obtenidos para cada marcador, y minimiza los errores que se puedan obtener bajo otras metodologías empleadas en el proceso de tinción y visualización de las bandas, además la metodología de marcadores fluorescentes es altamente aguda en la detección de los alelos con pequeñas diferencias. Los 93 individuos de *C. odorata* que componen a la plantación se clasificaron en seis áreas de muestreo que integran a las localidades de procedencia de los individuos ensayados (Veracruz (VER), Tabasco (TAB), Oaxaca (OAX), Frontera México- Guatemala (FMEX), Campeche (CAMP) y 10 individuos de procedencia desconocida considerada como el área DESC); con esto el análisis de la diversidad genética de la plantación se pretendió extrapolar a la diversidad de las poblaciones naturales distribuidas a lo largo del golfo y sureste de México, con la limitante de que la colecta de los individuos para comenzar los ensayos de progenies y procedencias de la especie no fue al azar si no se dirigió solo a individuos sobresalientes.

De los cinco microsatélites dos resultaron monomórficos (Ced 18 y Ced 41). El microsatélite Ced 2 resultó el más informativo y polimórfico, el cual presentó el mayor número de alelos (13), mientras que el menos diverso fue Ced 131 con 7 alelos. El número de alelos privados fue bajo (2 alelos en Ced 2 y uno en Ced 61) por lo que el

aislamiento de individuos podría descartarse. El área de TAB presentó los valores más altos en los parámetros de diversidad genética y los más bajos en el área considerada como DESC. De manera similar, en el área TAB se observaron el mayor número de alelos para cada microsatélite. Dos áreas mostraron desviaciones significativas del equilibrio de Hardy-Weinberg, las áreas fueron VER y OAX para el loci Ced 131, debido a un reducido número de heterocigotos. Existen varias razones por las que la heterocigosidad observada es mucho menor a la esperada, entre ellas el efecto Wahlund que se refiere a la reducción de la heterocigosidad en la población causado por la estructura de la subpoblación (combinación de dos muestras de diferentes poblaciones) (Dharmarajan *et al.*, 2013), otra posible causa del desequilibrio de Hardy-Weinberg es la consanguinidad o endogamia; para lo cual se determinó el coeficiente de consanguinidad (F_{IS}) y el coeficiente de endogamia total (F_{IT}) para cada locus, estos dos parámetros presentaron valores altos para el locus Ced 131 ($F_{IS}= 0.280$ y $F_{IT}= 0.32$), por lo cual se puede considerar que las áreas donde se presentaron las desviaciones al equilibrio de Hardy-Weinberg (VER y OAX), en el locus Ced 131, presentan cierto grado de endogamia, lo cual es de esperarse pues en los programas de mejoramiento genético se incluyen individuos altamente emparentados por presentar características de interés en común. Por otro lado, no se observó pruebas significativas para el equilibrio de ligamiento, por lo cual se puede concluir que todos los loci se segregan independientemente.

Los análisis de variabilidad genética de los 93 individuos de *C. odorata* indicaron un moderado grado de diferenciación genética (F_{ST} 0.032) entre las seis áreas de estudio, el AMOVA indicó esta diferenciación genética como significativa ($p < 0.05$), atribuida el 80% de la variación dentro de los individuos analizados. En las comparaciones de los valores de F_{ST} entre las seis áreas indicó un valor alto de diferenciación genética significativa entre el área DESC con respecto a las áreas VER, TAB y OAX, por el contrario no presenta diferenciación genética significativa al compararse con FMEX y CAMP, lo cual podría indicar que el área agrupada como DESC es una mezcla de individuos pertenecientes a las áreas de FMEX y CAMP, además el flujo genético entre el área DESC y FMEX presenta un valor alto ($N_m= 14.31$) en comparación del flujo genético entre las demás áreas (VER-DESC $N_m=$

2.67), lo cual coincide con lo poco que se conoce de estos individuos, los cuales fueron los primeros en incorporarse a los programas de mejoramiento en los años 80 y se cree que podrían proceder de la península de Yucatán, ya que sus primeros ensayos de progenie se establecieron en el campo experimental El Tormento, Campeche del INIFAP.

En general, el flujo genético entre las seis áreas es alto, esto coincide con el bajo número de alelos privados mencionado anteriormente, este flujo genético se relaciona al parecer con los polinizadores naturales de la especie que son capaces de volar largas distancias, y se observan también en los sitios dominados por el hombre. Además, los eventos de floración son frecuentados por pequeñas polillas, abejas y muchos otros tipos de insectos pequeños y, posiblemente, una polinización efectiva podría ser llevada a cabo por los insectos capaces de volar largas distancias (Patiño, 1997). Estudios de polinización de la especie deben ser desarrollados para entender el complejo de interacciones ecológicas que generan patrones de diversidad genética y de apareamiento.

El análisis de clúster por área muestra una similitud entre las áreas TAB y FMEX, las cual presentan entre ellas un valor de ∞ para el número de migrantes por población (N_m), sin embargo esta similitud no se observo en el análisis de clúster de los 93 individuos de *C. odorata*, donde la similitud entre individuos no está definida por las áreas evaluadas. Conjuntamente, la moderada variabilidad encontrada en los individuos de *C. odorata* en este estudio, es explicada en el análisis de la estructura poblacional donde se clasifica a los individuos genotipificados con cinco loci microsatélites en tan solo dos poblaciones, donde los 93 individuos distribuidos en las seis aéreas de muestreo tienen una probabilidad entre 0.4 a 0.6 de pertenecer a cualquiera de las dos poblaciones. Estos dos grupos de poblaciones se explican también por el hecho que el muestreo que se hizo de los individuos no fue al azar, si no que se colectaron individuos con características sobresalientes en común.

Al comparar los resultados del presente trabajo con estudios genéticos reportados utilizando marcadores microsatélites, Hernández *et al.* (2007) evaluó nueve marcadores microsatélites (Ced 2, Ced 18, Ced 41, Ced 44, Ced 54, Ced 61, Ced 95 y Ced 131) en 487 individuos de *C. odorata* de 12 poblaciones distribuidas a

lo largo de Mesoamérica, donde se encontraron 19 alelos para Ced 2 con una $H_o = 0.85$ y $H_e = 0.84$, 14 alelos para Ced 61 con una $H_o = 0.60$ y $H_e = 0.86$ y 14 alelos para Ced 131 con una $H_o = 0.74$ y $H_e = 0.82$; en el presente estudio se presentaron 13 alelos para Ced 2 con una $H_o = 0.84$ y $H_e = 0.79$, 8 alelos para Ced 61 con una $H_o = 0.72$ y $H_e = 0.740$ y 7 alelos para Ced 131 con una $H_o = 0.492$ y $H_e = 0.696$; en comparación se observa una menor proporción de alelos encontrados en nuestro estudio, esto se puede atribuir principalmente a la diferenciación en el número de individuos analizados (487 y 93) y la distribución de los mismos, sin embargo el número de alelos encontrados en el presente trabajo es significativo.

Diversos estudios han evaluado la diferenciación genética (F_{ST}) entre poblaciones naturales de *C. odorata*, De la Torre *et al.* (2008) reportó un valor de F_{ST} de 0.20 entre nueve poblaciones de Perú. Cavers *et al.* (2003b) determinó Φ_{ST} (un análogo de F_{ST} basado en la partición de la varianza molecular entre y dentro de las poblaciones (Excoffier *et al.*, 1992)) para dos grupos de poblaciones de *C. odorata* localizados en Costa Rica, con valores de Φ_{ST} de 0.47 para el primer grupo de poblaciones y un Φ_{ST} de 0.47 en el segundo grupo de poblaciones. Estos estudios cubren una amplia área geográfica en comparación de los incluidos en nuestra investigación. En este sentido, de acuerdo a los criterios Yeh's (2000) los valores para encontrar una estructura genética grande son $0.15 < F_{ST} \leq 0.25$ y para una estructura genética de moderada a grande es $0.05 < F_{ST} \leq 0.15$. Los valores de F_{ST} encontrados en este estudio son menores a los discutidos anteriormente, para esto hay que considerar que la diversificación de *C. odorata* empezó en América del Sur con una subsecuente recolonización en América Central (Cavers *et al.*, 2013). Asimismo, se han reportados tres linajes genéticos de *C. odorata* a lo largo de su área de distribución (linaje norte, central y sur de América) y se conoce que el flujo de semillas entre poblaciones del linaje el Norte y Central es restringido, causando una clara diferenciación entre estos dos linajes (Cavers *et al.*, 2003a).

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que *C. odorata* cultivada en el sureste de México tiene una base genética adecuada, lo que hace posible el mejoramiento genético a largo plazo (Yeatman *et al.*, 1987). En este sentido, la diversidad genética de un cultivo es importante para evitar cuellos de botella

genéticos que se han causado en numerosos cultivos durante su domesticación a través de las prácticas modernas de cultivo, donde los alelos perdidos se pudieran recuperar sólo en los ancestros silvestres (Tanksley, 1997). Adicionalmente, la diversidad alélica y la diferenciación genética dentro de la plantación de estudio, reduce su vulnerabilidad ante enfermedades, ataque de plagas, el cambio climático y otros eventos catastróficos. De esta forma, aumenta la capacidad para adaptarse a las condiciones cambiantes lo que implica en gran medida el establecimiento de plantaciones exitosas en diversos ambientes, lo que conlleva al desarrollo de plantaciones forestales comerciales sostenibles a largo plazo para la obtención de volúmenes considerables de madera, y de esta manera aligerar la presión que se ejerce en los bosques naturales con la sobreexplotación de la especie, garantizando su manejo forestal sustentable.

7.3 Asociación de los compuestos fitoquímicos entre el crecimiento maderable y el ataque al barrenador

El monitoreo de la concentración de fenoles y limonoides en las cuatro plantaciones nos permitió conocer el comportamiento fitoquímico de los árboles en diferentes condiciones de manejo, y así poder determinar la asociación entre las variables de estudio. En primera instancia el análisis de correlación canónica nos indicó una correlación de las variables fitoquímicas (limonoides y fenoles) con las variables de crecimiento (altura y diámetro) ($R_c = 0.50$ $p = 0.04$) y con las variables de ataque (número de ataques y número de ramas) ($R_c = 0.40$ $p = 0.03$). Estas asociaciones se hacen más evidentes en el análisis de correlación de Pearson y Spearman ($p < .05$), donde se encontró una correlación negativa entre la concentración de fenoles, de forma descendente con: la poda, el diámetro, número de ataques, rectitud y altura, por otro lado la concentración de limonoides se asoció de forma descendente con: la aplicación de insecticida, la poda, el número de ramas y rectitud. En estas asociaciones es evidente la influencia que tienen las condiciones de manejo de la plantación (aplicación de poda e insecticida) en la producción de los

fitoquímicos (fenoles y limonoides), pues las mayores correlaciones se alcanzan entre los fenoles- poda (correlación negativa) y limonoides-insecticida.

Lo expuesto en la primera parte de la discusión de la variabilidad fitoquímica, donde señalamos la importancia de los fenoles en cuanto al ataque del barrenador, coincide con lo demostrado en las asociaciones significativas, pues se observó que entre más concentración de fenoles se produce menos ataque; sin embargo, la interacción de las demás variables es crucial para comprender una aproximación sobre la respuesta final del árbol al ataque. Estas interacciones al parecer comienzan con la poda de los árboles y la aplicación de insecticidas, para esto hay que tomar en cuenta que la plantación con menos manejo fue El Palmar, donde no hubo poda y no se aplicó insecticida, por lo tanto podría inferirse que por la alta producción de fenoles en esta plantación, el ataque del barrenador no fue significativo. Por otro lado, en la plantación de Santa Genoveva donde se podaron arboles, y en Isla donde se aplicaron insecticidas y podas, tuvieron la mayor incidencia del ataque del barrenador y presentaron una mayor concentración de limonoides respecto a la plantación El Palmar. Por lo que inferimos que los árboles al ser podados quedan más expuestos al ataque, pues con la poda se produce una herida que deja más expuesto al árbol y a los compuestos que pudieran actuar como atrayentes, en campo se observó que prácticamente todas las heridas hechas por la poda tenían galerías del barrenador; al parecer estos dos factores, propician que los árboles enfoca su metabolismo secundario a una mayor producción de limonoides, probablemente como una respuesta de tolerancia al estrés causado por uno o varios de los siguientes factores: la poda de ramas, la aplicación de insecticidas o el ataque del barrenador. Sin embargo, para comprender mejor estas interacciones se requiere de más experimentos, donde las variables a evaluar sean más homogéneas entre las plantaciones. Además, en el agrupamiento de las plantaciones (figura 39) se observa una fuerte interacción genotipo-ambiente pues los individuos se agrupan de acuerdo a la plantación, lo que resulta al parecer en una plasticidad fenotípica en *C. odorata*.

En este sentido, Pérez-Flores *et al.* (2012) evaluó el efecto de extractos foliares de fenoles y limonoides de *C. odorata* en la sobrevivencia y desarrollo de larvas de *hypsipyla grandella*. En este estudio observaron que los limonoides y fenoles afectan

la sobrevivencia de las larvas de manera diferente. Los limonoides afectaron la sobrevivencia de las larvas y los extractos fenólicos fueron los mejores para disminuir el consumo de disco foliar y la ganancia de peso de larvas. Larvas criadas en discos rociadas con limonoides sobrevivieron menos en comparación con larvas criadas en discos rociadas con fenoles.

Contrariamente a lo esperado, los sitios como Santa Genoveva e Isla, donde la incidencia del barrenador fue mayor, los árboles presentaron el mayor crecimiento, la asociación de estas dos variables fue altamente significativa ($r = 0.72$). Esta asociación no se ha sido reportada anteriormente, pues está ampliamente documentado que el barrenador causa su mayor daño al atacar el brote principal provocando una reducción del crecimiento (Hilje y Cornelius, 2001). Al respecto, se puede inferir lo siguiente, posiblemente se pueda deber a que los árboles más productivos tienen una mayor actividad meristemática y por consiguiente mayor producción de metabolitos atrayentes del barrenador, o contrastantemente podría ser que el daño del barrenador active una estrategia de defensa en la planta para escapar del daño con un crecimiento vigoroso que cicatrice heridas e intente dominar de manera más rápida su espacio de crecimiento.

7.4 Selección de individuos para su selección y mejoramiento

Los individuos propuestos para su conservación y mejoramiento presentados en el cuadro 38 fueron seleccionados en base a los estudios fitoquímicos y moleculares desarrollados en el presente trabajo. Principalmente recomendamos a los individuos del área TAB, integrada por los individuos de Teapa, Tabasco y Cárdenas, Tabasco, dado que en el estudio de la variabilidad molecular esta área fue identificada con la mayor diversidad alélica y con los mayores parámetros de diversidad genética, además parece estar en equilibrio. Por ello, es evidente que los individuos de *C. odorata* procedentes de Tabasco deben recibir una alta prioridad para la conservación *ex situ* de la especie y su mejoramiento. Por otro lado también recomendamos en base a los estudios fitoquímicos, a los individuos que su concentración de fenoles y limonoides permaneciera constante en las tres

plantaciones, lo que indica que su la producción de sus metabolitos no está influenciada por las condiciones ambientales o características del sitio. Además, algunos aspectos de crecimiento y ataque fueron considerados para la selección. A continuación se presentan las razones particulares de cada individuo: 1) C115-Tezonapa, Veracruz, altas concentraciones de fenoles de manera constante en las tres plantaciones; 2) C58-Teapa, Tabasco, presenta altas concentraciones de limonoides de manera constante y presenta un alto crecimiento; 3) C45-Teapa, Tabasco, es uno de los individuos que alcanza mayor altura; 4) C103 Golfo, Veracruz, es poco atacado pero presenta poco crecimiento; y por último 5) C64-Cárdenas, Tabasco, mejor recuperación y rectitud.

8 CONCLUSIONES

- Los individuos de *C. odorata* evaluados resultaron altamente variables en la concentración de fenoles totales, flavonoides y limonoides, observándose diferencias marcadas entre procedencias.
- Los cromatogramas de HPLC de los extractos fenólicos evaluados presentaron semejanza química, en los cuales su compuesto mayoritario corresponde un flavonol, de tipo glicósido de kaempferol. Se identificó la presencia catequina a diferentes concentraciones. Mediante CG-MS se logró identificar a los sesquiterpenos β -elemeno, E-cariofileno, aromadendreno, humuleno, gama cadineno y D-germacreno, y los poli terpenos Di- α -Tocoferol y β -sitosterol.
- Los individuos de *C. odorata* que integran la plantación presentan diferenciación genética y diversidad alélica, por lo que se puede concluir que tiene una base genética adecuada, lo que hace posible el mejoramiento genético a largo plazo, además de reducir su vulnerabilidad ante enfermedades, ataque de plagas y el cambio climático. Lo que proporcionara el establecimiento de plantaciones comerciales exitosas para asegurar volúmenes aprovechables de madera en el futuro, y así aligerar la presión que se hace en los bosques naturales.
- Las concentraciones de fenoles y limonoides presentes en los individuos de *C. odorata* evaluados presentan un cierto grado de asociación con el ataque del barrenador y el crecimiento maderable. Se observó que en mayor sea el contenido fenólico hay menos ataque.
- Se seleccionaron los individuos C115, C58, C45, C103, C45 y C64, para su conservación *ex situ* y su mejoramiento genético, en base a los estudios fitoquímicos y moleculares desarrollados en el presente trabajo.

9 RECOMENDACIONES

- Es necesario realizar el monitoreo de los fitoquímicos en plantaciones donde el manejo sea uniforme, para un mejor entendimiento de las interacciones de los metabolitos, el crecimiento y el ataque. En estos experimentos no es necesario realizar podas ni aplicar insecticidas pues lo que se busca es observar el comportamiento de los arboles al ataque.
- Las plantaciones analizadas están en crecimiento, un seguimiento en el futuro es importante.
- Recomendamos ampliamente tomar acciones para la conservación *ex situ* de los individuos de Teapa, Tabasco y Cárdenas, Tabasco.

10 BIBLIOGRAFÍA

Allan, G. G., Gara, R. I., & Wilkins, R. M., (1970) Studies on the shootborer *Hypsipyla grandella* Zeller. III. The evolution of some systemic insecticides for the control of larvae in *C. odorata* L. *Turrialba*. 20, 478-487.

Arteaga, M. B. & Izaguirre, R. C., (2004) Comportamiento de especies tropicales bajo tres sistemas de plantación. *Forestal Veracruzana*, 6, 45-51.

Asekun, O. T., & Ekundayo, O. (1999). Constituents of the leaf essential oil of *C. odorata* L. from Nigeria. *Flavour and fragrance journal*, 14(6), 390-392. doi: 10.1002/(SICI)1099-1026(199911/12)14:6<390::AIDFFJ850>3.0.CO;2-3

Avalos, G. A., & Pérez-Urria, C. E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*, 2(3), 119-145.

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

Balandrin, M., Klocke J. A., (1985). Natural plant chemicals: Sources of industrial and medicinal materials. *Science*, 228, 1154-1160.

Boyle, T. J. B., Dale, V., Eeley, H., Finegan, B., Lawes, M., Manokaran, N., & Soberon, J. (1997). *Criteria and indicators for assessing the sustainability of forest management: conservation of biodiversity* (No. 17). Jakarta: Center for International Forestry Research.

Campos, M.G., & Markham, K.R. (2007). *Structure information from HPLC and on-line measured absorption spectra-flavone, flavonols and phenolic acids*. Portugal: Coimbra University Press.

Caporale, L. H. (1995) Chemical ecology: a view from the pharmaceutical industry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(1), 75-82

Cavers, S., Navarro, C., & Lowe, A. J. (2003a). Chloroplast DNA phylogeography reveals colonization history of a Neotropical tree, *C. odorata* L., in Mesoamerica. *Molecular Ecology*, 12(6), 1451-1460.

Cavers, S., Navarro, C., & Lowe, A. J. (2003b). A combination of molecular markers identifies evolutionarily significant units in *C. odorata* L.(Meliaceae) in Costa Rica. *Conservation Genetics*, 4(5), 571-580.

Cavers, S., Telford, A., Arenal Cruz, F., Pérez Castañeda, A. J., Valencia, R., Navarro, C., & Vendramin, G. G. (2013). Cryptic species and phylogeographical structure in the tree *C. odorata* L. throughout the Neotropics. *Journal of Biogeography*, 40(4), 732-746.

Céspedes, L. C., Calderón, S. J., Lina, L., & Aranda, E. (2000). Growth inhibitory effects on fall armyworm *Spodopetera frugiperda* of some limonoids isolated from *Cedrela* spp. (Meliaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1903-1908. doi: 10.1021/jf990443q

Champagne, D. E., Koul, O., Isman, M. B., Scudder, G. G., & Towers, G.H. (1992). Biological activity of limonoids from the Rutales. *Phytochemistry*, 31(2), 377-394. doi: 10.1016/0031-9422(92)90003-9

Chatterjee, A. T., Chakraborty, T. & Chandrasekharan, S. (1971). Chemical investigation of *Cedrela toona*. *Phytochemistry*, 10, 2533-2535.

Cheng, H. H. & Crittenden, L. B. (1994). Microsatellite markers for genetic mapping in the chicken. *Poultry Science*. 73: 539-546.

Cintron, B. B. (1990). *C. odorata* L. Cedro Hembra, Spanish Cedar, Meliaceae. Mahogany family. *Silbéis of North America. Hardwods. Agric. Handbook*, 654, 250-257.

Conner, J. K. & Hartl, D. L. (2004). A primer of ecological genetics. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, U.S.A. 304.

Cordero, J., & Boshier, D. H., (2003) Árboles de Centroamérica: un manual para extensionistas. CATIE, Turrialba, CR.

Cornelius, J. P., & Watt, A. D. (2003). Genetic variation in a *Hypsipyla*-attacked clonal trial of *C. odorata* under two pruning regimes. *Forest Ecology and Management*, 183(1), 341-349. doi: 10.1016/S0378-1127(03)00142-7

Croteau, R., Kutchan, T. M., & Lewis, N. G., (2000). Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and molecular biology of plants*, 24, 1250-1319.

Da Silva, M. F. G. F., Agostinho, S. M., de Paula, J. R., Neto, J. O., Castro-Gamboa, I., Rodrigues, F. E., Fernandes, J. B., & Vieira, P. C. (1999). Chemistry of *Toona ciliata* and *C. odorata* graft (Meliaceae): chemosystematic and ecological significance. *Pure Applied Chemistry*, 71(6), 1083-1087.

Dai, J., Yaylayan, V. A., Raghavan, G. V., & Parè, J. R. (1999). Extraction and colorimetric determination of azadirachtin-related limonoids in neem seed kernel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(9), 3738-3742. doi: 10.1021/jf990227h

Dallas, J. F. (1992). Estimation of microsatellite mutation rates in recombinant inbred strains of mouse. *Mammalian Genome*, 3, 8, 452-456.

De la Torre, A., López, C., Yglesias, E., & Cornelius, J. P. (2008). Genetic (AFLP) diversity of nine *C. odorata* populations in Madre de Dios, southern Peruvian

Amazon. *Forest Ecology and Management*, 255(2), 334-339. doi: 10.1016/j.foreco.2007.09.058

De Paula, J., Vieira, I. J., Da Silva, M. F. G. F., Fernandes, J. B., Vieira, P. C., Pinheiro, A. L., & Vilela, E. F. (1997). Sesquiterpenes, triterpenoids, limonoids and flavonoids of *C. odorata* graft and speculations on the induced resistance against *Hypsipyla grandella*. *Phytochemistry*, 44(8), 1449-1454. doi: 10.1016/S0031-9422(96)00747-9

Dewanto, V., Wu, X., Adom, K. & Liu, R. (2002) Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 50: 3010-3014.

Dharmarajan, G., Beatty, W. S., & Rhodes, O. E. (2013). Heterozygote deficiencies caused by a Wahlund effect: Dispelling unfounded expectations. *The Journal of Wildlife Management*, 77(2), 226-234.

Di Rienzo, A., Peterson, A. C., Garza, J. C., Valdes, A. M., Slatkin, M., & Freimer, N. B. (1994). Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(8), 3166-3170.

Dixon, R. A., (2001) Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 411, 843–847

Earl, Dent A. and vonHoldt, Bridgett M. (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* vol. 4 (2) pp. 359-361 doi: 10.1007/s12686-011-9548-7

Ellegren, H. (1995). Mutation rates at porcine microsatellite loci. *Mammalian Genome*, 6(5), 376-377.

Excoffier, L., Smouse, P. E., & Quattro, J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131(2), 479-491.

Excoffier L., Lischer H. E. L. (2010) Arlequin suite v3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10, 564–567.

Frankham, R., Ballou, J. D., Briscoe, D. A. (2004). A primer of conservation genetics Cambridge, UK. Cambridge University Press. 220 p.

Gillies, A. C. M., Cornelius, J. P., Newton, A. C., Navarro, C., Hernandez, M., & Wilson, J. (1997). Genetic variation in Costa Rican populations of the tropical timber species *C. odorata* L., assessed using RAPDs. *Molecular Ecology*, 6(12), 1133-1145.

González-Coloma, A., Reina, M., Sáenz, C., Lacret, R., Ruiz-Mesia, L., Arán, V. J., Sanz, J., & Martínez-Díaz, R. A. (2012). Antileishmanial, antitrypanosomal, and cytotoxic screening of ethnopharmacologically selected Peruvian plants. *Parasitology Research*, 110(4), 1381-1392. doi: 10.1007/s00436-011-2638/3

Grijpma, P. y Roberts, S. C. (1975) Biological and chemical screening for the basis of resistance of *Toona ciliata* M.J. Roem. var. *Australis*. *Turrialba* 25:152–159

Grijpma, P. (1976) Resistance of Meliaceae against the shoot borer *Hypsipyla grandella* with particular reference to *Toona ciliate* M.J. Roem var. *Australis*. Burley J, Styles BT (eds) *Tropical trees: variation, breeding and conservation*. Academic Press, London, 69–78

Grogan, J., Barreto, P., Veríssimo, A., (2002). Mahogany in the Brazilian Amazon: Ecology and Perspectives on Management. Imazon, Belém, Pará, Brazil.

Hammer, Ø., Harper, D.A.T., & Ryan, P.D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp. Recuperado de: http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm

Harborne, J. B. (1973). *Phytochemical methods*, London: Chapman and Hall.

Harborne, J. B., (1989). General procedures and measurement of total phenolics. *Methods in plant biochemistry*, Academic Press, London, 1, 1-28.

Harborne, J. B. (2001). Twenty-five years of chemical ecology. *Natural product reports*, 18(4), 361-379. doi: 10.1039/B005311M

Hauxwell, C., Mayhew, J. E., Newton A. C., (2001). Silvicultural management of *Hypsipyla* spp. In Floyd R. B., Hauxwell C., (eds.), International Workshop on *Hypsipyla* shoot borers in Meliaceae. *ACIAR Proceedings*, 97, 151-163.

Heimler, D., Vignolini, P., Dini, M., & Romani, A. (2005). Rapid test to assess the antioxidant activity of *Phaseolus vulgaris* L. dry beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(8), 3053–3056. doi: 10.1021/jf049001r

Hernández, G., Buonamici, A., Walker, K., Vendramin, G., Navarro, C. & Cavers, S. (2007). Isolation and characterization of microsatellite markers for *C. odorata* L. (Meliaceae), a high value neotropical tree. *Technical Note, Conservation Genetics*, 9, 475-459.

Hilje, L., & Cornelius, J. (2001). ¿Es inmanejable *Hypsipyla grandella* como plaga forestal?. *Manejo Integrado de Plagas*, 61, 1-4.

INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía (1997). Producción forestal de México. *VII Censo Agropecuario*

Karp, A., & Edwards, K. J. (1997). DNA markers: a global overview. *DNA markers: protocols, applications, and overviews*, 1-13.

Kipassa, N. T., Iwagawa, T., Okamura, H., Doe, M., Morimoto, Y., & Nakatani, M. (2008). Limonoids from the stem bark of *C. odorata*. *Phytochemistry*, 69(8), 1782-1787. doi:10.1016/j.phytochem.2007.12.015

Koul, O., & Isman, M. B. (1992). Toxicity of the limonoid allelochemical cedrelone to noctuid larvae. *Entomologia experimentalis et applicata*, 64(3), 281-287.

Larrea, R. G., de los Santos Posadas, H. M., & Hernández, J. I. V. (2008). Crecimiento y rendimiento maderable de *C. odorata* L. y *Tabebuia donnell-smithii* Rose en San José Chacalapa, Pochutla, Oaxaca. *Madera y bosques*, 14(2), 65-82.

Lamb, F. B., (1966). Mahogany of Tropical America. Its Ecology and Management. *University of Michigan Press*, Ann Arbor.

Lee, I. S., Wei, C., Thuong, P. T., Song, K. S., Seong, Y. H., & Bae, K. H. (2006). Antioxidant constituents from the leaves of *Cedrela sinensis* A. Juss. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, 14(5), 267-272.

Lowe, A., Harris, S., Ashton, P. (2004). Ecological genetics: design, analysis, and application. Malden, MA (EUA). Blackwell. 326.

Mabry, T. J., Markham, K. R., & Thomas, M. B., (1970). *The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer-Verlag, New York.

Macías-Sámano, J. E. (2001). Interacciones químicas entre *Hypsipyla grandella* y sus plantas hospedantes. *Manejo Integrado de Plagas*, 60, 15-21.

Maia, B. H., Paula, J. R. D., Sant'Ana, J., Silva, M. F. G. F., Fernandes, J. B., Vieira, P. C., Costa, M. S. S., Oashi, O. S., & Silva, J. N. M. (2000). Essential oils of *Toona* and *Cedrela* species (Meliaceae): taxonomic and ecological implications. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 11(6), 629-639.

Markham, K. R. (1982). *Techniques of flavonoid identification*. London: Academic press.

Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., & Culebras, J. M., (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria*, 17.

Martins, A. P., Salgueiro, L. R., da Cunha, A. P., Vila, R., Cañigüeral, S., Tomi, F., & Casanova, J. (2003). Chemical composition of the bark oil of *C. odorata* from S. Tome and Principe. *Journal of Essential Oil Research*, 15(6), 422-424. doi: 10.1080/10412905.2003.9698629

Mayhew, J. E., Newton A. C., (1998). The Silviculture of Mahogany. *CABI Publications*, Wallingford, UK.

Missiaggia, A., & Grattapaglia, D. (2006). Plant microsatellite genotyping with 4-color fluorescent detection using multiple-tailed primers. *Genet Mol Res*, 5(1), 72-78.

Mohammadi, S. A., & Prasanna, B. M., (2003). Analysis of Genetic Diversity in Crop Plants - Salient Statistical Tools and Considerations". *Crop Science*. 43, 1235-1248.

Murcia, V. J., & Dorantes L., (1996) Establecimiento de plantaciones comerciales de uso múltiple en la región de Los Tuxtlas, Ver. *Novena Reunión Científica-Tecnológica Forestal y Agropecuaria*. Veracruz, México, 33-38.

Nason, J. D. (2002). La estructura genética de las poblaciones de árboles. *In* Guariguata, MR; Kattan, GH. eds. *Ecología y conservación de bosques neotropicales*. Cartago, CR. LUR. p. 299-327.

Navarro, C., & Hernández, M. (2004). Genetic variability of *C. odorata* Linneaus: results of early performance of provenances and families from Mesoamerica grown in association with coffee. *Forest Ecology and Management*, 192, 217–227

Navarro, C., Cavers, S., Pappinen, A., Tigerstedt, P., Lowe, A. J., & Merila, J. (2005). Contrasting quantitative traits and neutral genetic markers for genetic resource assessment of Mesoamerican *C. odorata*. *Silvae Genetica*, 54(6), 281-292.

Newton, A. C., Cornelius, J. P., Mesen, J. F., & Leakey, R. R. B. (1995). Genetic variation in apical dominance of *C. odorata* seedlings in response to decapitation. *Silvae Genetica*, 44(2), 146-149.

Newton, A. C., Baker, P., Ramnarine S., Mesén J. F., Leakey, R. R. B., (1993a). The mahogany shoot borer: prospects for control. *Forest Ecology and Management*, 57, 301-328.

Newton, A. C., Leakey, R. R. B., & Mesean, J. F. (1993b). Genetic variation in mahoganies: Its importance, utilization and conservation. *Biodiversity and Conservation*, 2(2), 114-126.

Newton, A. C., Watt, A. D., Lopez, F., Cornelius, J. P., Mesén, J. F., & Corea, E. A. (1999). Genetic variation in host susceptibility to attack by the mahogany shoot borer, *Hypsipyla grandella* (Zeller). *Agricultural and Forest Entomology*, 1(1), 11-18.

Lattanzio, V., Kroon, P. A., Quideau, S., & Treutter, D., (2008). Plant phenolics-secondary metabolites with diverse functions. *Recent advances in polyphenol research*, 1, 1-35.

Omar, S., Zhang, J., MacKinnon, S. A., Leaman, D., Durst, T., Philogene, B. J. R., Arnason, J. T., Sánchez-Vindas, P.E., Poveda, L., Tamez, P.A., & Pezzuto, J. M. (2003). Traditionally-used antimalarials from the Meliaceae. *Current topics in medicinal chemistry*, 3(2), 133-139. doi: 1568-0266/03

Pare, P. W., & Tumlinson, J. H. (1997). De novo biosynthesis of volatiles induced by insect herbivory in cotton plants. *Plant Physiol.* 114, 1161-1167.

Pare, P. W., & Tumlinson, J. H. (1999). Plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiol.* 121: 325-331.

Patiño, V. F. (1997). Genetic resources of *Swietenia macrophylla* and *C. odorata* in the neotropics: Priorities for coordinates actions. *Forest Genetic Resources*, 25, 20-32.

Peakall, R. and Smouse, P.E. (2006) GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes*, 6, 288-295.

Pennington, T. D., & Sarukhan, J. (2005). Árboles Tropicales de México. Manual Para Identificación de Las Principales Especies.

Pérez-Flores, J., Eigenbrode, S. D., & Hilje-Quiroz, L. H. (2012). Alkaloids, Limonoids and Phenols from Meliaceae Species Decrease Survival and Performance of *Hypsipyla grandella* Larvae. *American Journal of Plant Sciences*, 3(7), 988-994. doi: 10.4236/ajps.2012.37117

Pérez-Salicrup, D. R., & Esquivel, R. (2008). Tree infection by *Hypsipyla grandella* in *Swietenia macrophylla* and *C. odorata* (Meliaceae) in Mexico's southern Yucatan Peninsula. *Forest ecology and management*, 255(2), 324-327. doi: 10.1016/j.foreco.2007.09.054

Perrier, X., Jacquemoud-Collet, J.P. (2006). DARwin software <http://darwin.cirad.fr/>

Phillips-Mora, W., Rodríguez, H. & Fritz P., (1995). Marcadores de ADN: Teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo con ejemplos e investigaciones en cacao (*Theobroma cacao*). San José, Costa Rica. Serie Técnica. Informe 252,185.

Powell, W. (1992) *Plant genomes, gene markers, and linkage maps*. J.P. Moss (ed.), Biotechnology and Crop Improvement In Asia. Int. Crop. Res. Inst. For the Semi-Arid Tropics, Patancheru, India, 297-322

Ramírez, G. C., Vera, C. G., Carrillo, A. F., & Magaña T. O., (2008) El cedro rojo (*C. odorata* L.) como alternativa de reconversión en terrenos abandonados por la agricultura comercial en el sur de Tamaulipas. *Agricultura técnica en México*, 34, 243-250.

Ramputh, A., Teshome, A., Bergvinson, D. J., Nozzolillo, C., & Arnason, J. T. (1999). Soluble phenolic content as an indicator of sorghum grain resistance to *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*, 35(1), 57-64. doi: 10.1016/S0022-474X(98)00030-7

Rice, W. R. (1989). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 223-225.

Rosales-Castro, M., González-Laredo, R. F., Rocha-Guzmán, N. E., Gallegos-Infante, J. A., Peralta-Cruz, J., & Karchesy, J. J. (2009). Evaluación química y capacidad antioxidante de extractos polifenólicos de cortezas de *Pinus cooperi*, *P. engelmannii*, *P. leiophylla* y *P. teocote*. *Madera y bosques*, 15(3), 87-105.

Rosales-Castro, M., González-Laredo, R. F., Rocha-Guzmán, N. E., Gallegos-Infante, J. A., Rivas-Arreola, M. J., & Karchesy, J. J. (2012). Antioxidant activity of fractions from *Quercus sideroxyla* bark and identification of proanthocyanidins by

HPLC-DAD and HPLC-MS. *Holzforschung*, 66(5), 577-584. doi: 10.1515/hf-2011-0157

Roy, A., & Saraf, S. (2006). Limonoids: overview of significant bioactive triterpenes distributed in plants kingdom. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(2), 191-201.

Sambrook, J. & Rusell, D. (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. Tercera Edición. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, NY.

Sánchez, M. V., Salazar, G. J., Vargas, H. J. J., López, U. J., & Jasso, M. J. (2003). Parámetros genéticos y respuesta a la selección en características del crecimiento de *C. odorata* L. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 26(1), 19-27.

Sands, D. P. A. & Murphy, S. T., (2001). Prospects for biological control of *Hypsipyla* spp. with insect agents. *In* International Workshop on *Hypsipyla* shoot borers in Meliaceae. Floyd R. B., Hauxwell C. (eds.), *ACIAR Proceedings* , 97,121-130

Schoonhoven, L. M. (1982) Biological aspects of antifeedants. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 31: 57-69.

SEMARNAT, Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. *NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo, 2010*. México.

Sepúlveda, J. G., Porta, D. H., & Rocha, S. M., (2003) La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana Fitopatología*, 21, 355-363.

Saxena, S., Pant, N., Jain, D. C., & Bhakuni, R. S. (2003). Antimalarial agents from plant sources. *Current Science*, 85(9), 1314-1329.

Sidhu, O. P., Kumar, V., & Behl, H. M. (2004). Variability in triterpenoids (nimbin and salanin) composition of neem among different provenances of India. *Industrial Crops and Products*, 19(1), 69-75.

Silva, E. M., Souza, J. N. S., Rogez, H., Rees, J. F., & Larondelle, Y. (2007). Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chemistry*, 101(3), 1012-1018. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.02.055

Smolenski S., Silinis, H. & Farnworth, M. (1974). Alkaloid screening IV. *Lloydia*, 37, 30-61.

Soto, F., Hilje, L., Mora, G. A., & Carballo, M. (2011). Phagodeterrence by *Quassia amara* (Simaroubaceae) wood extract fractions on *Hypsipyla grandella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *Revista de Biología Tropical*, 59(1), 487-499. doi: <http://dx.doi.org/10.15517/rbt.v59i1.3215>

StatSoft, Inc. (2004). STATISTICA (data analysis software system), version 7. www.statsoft.com

Tanksley, S. D., & Mccouch, S. R. (1997). "Seed Banks and Molecular Maps: Unlocking Genetic Potential from the Wild". *Science*, 277, 1063-1066.

Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). Secondary metabolites and plant defense. *Plant physiology*, 4, 315-344.

Tautz, D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source of polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* 17, 6463-6471.

Villanueva, H. E., Tuten, J. A., Haber, W. A., & Setzer, W. N. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of the bark essential oil of *C. odorata* from Monteverde, Costa Rica. *Der Pharma Chemica*, 1(2), 14-18.

Waterman, P. G., & Mole, S. (1994) *Analysis of Phenolic Plant Metabolites. Methods in Ecology*. Boston: Blackwell Scientific Publications.

Watt, A. D., Newton, A. C., Cornelius, J. P., (2001). Research in resistance of mahoganies to *Hypsipyla* species. pp. 89-96. In Floyd RB, Hauxwell C (eds.), International Workshop on *Hypsipyla* shoot borers in Meliaceae, ACIAR Proceedings, 97, 20-23.

Weber, J. L., & Wong, C. (1993). Mutation of human short tandem repeats. *Human molecular genetics*, 2(8), 1123-1128.

Yeh, F. C., Young, A., Boshier, D., & Boyle, T. (2000). Population genetics. *Forest conservation genetics: principles and practice*, 21-37.

Yeatman, C. W., Kafton, D., & Wilkes, G. (1984). *Plant genetic resources: a conservation imperative*. Westview Press, Inc.(available from Bowker Publishing Co., Epping, United Kingdom.) AAAS Selected Symposium 87.