

## ESTUDIO PRELIMINAR DE LA ECOGENÉTICA DE LA ESPECIE NEOTROPICAL DE MANGLE *PELLICIERA RHIZOPHORAE* TRIANA Y PLANCHÓN, EN LA COSTA DEL PACÍFICO COLOMBIANO

PRELIMINARY STUDY OF THE ECOGENETICS OF THE NEOTROPICAL MANGROVE SPECIES *PELLICIERA RHIZOPHORAE* TRIANA AND PLANCHON, IN THE COLOMBIAN PACIFIC COAST

María F. Castillo-Cárdenas<sup>1</sup>, Nelson Toro-Perea<sup>2</sup>, Heiber Cárdenas-Henao<sup>3</sup>

### Resumen

*Pelliciera rhizophorae* es una especie neotropical de mangle, la única especie representante de su género, cuya distribución actual está casi restringida a la costa del Pacífico americano. Como una contribución al conocimiento de la ecogenética de *P. rhizophorae* se realizó un análisis de su variabilidad genética y morfológica en el Pacífico colombiano y los factores ambientales asociados en seis localidades: Virudó, Charambirá, Isla La Plata, Tumaco, Milagros y Chontal (Colombia). El análisis de diversidad genética realizado mediante marcadores moleculares AFLP, produjo 225 fragmentos amplificados con 155 (69%) polimórficos en 57 individuos de *P. rhizophorae* colectados en las seis zonas del Pacífico colombiano. La diversidad genética dentro de poblaciones reveló niveles de variación más bajos en Isla La Plata y Tumaco y el más alto en Chontal ( $H_{ep} = 0,187$ ). Esta especie en el Pacífico colombiano resultó estar significativamente estructurada ( $\phi_{st} = 0,2654$ ), con un 73,5% de variación dentro de poblaciones. La diferenciación genética no mostró correlación con la distancia geográfica entre zonas. Esto sugiere que la dinámica poblacional de la especie está asociada con procesos históricos influenciados por factores ecológicos y ambientales. El estudio de la variabilidad morfológica, reveló un óptimo desarrollo de los árboles en la localidad de Virudó, una zona constituida por manglar de ribera; en contraste, Tumaco, Milagros y Charambirá, mostraron un fenotipo disminuido, a pesar de ser también manglares de ribera. El análisis de suelo determinó que el sustrato de anclaje de la especie está compuesto en su mayoría por arenas muy finas y arcillas y, aunque la salinidad medida en agua intersticial mostró una ligera variación entre las zonas de estudio, estas características parecen ser adecuadas para la sobrevivencia de la especie.

**Palabras clave:** AFLP, Colombia, costa del Pacífico, diversidad genética, estructura poblacional, granulometría, morfología, *Pelliciera rhizophorae*.

### Abstract

*Pelliciera rhizophorae* is a Neotropical mangrove, the only representative of this genus, whose distribution is mostly restricted to the Pacific Coast. This study is a contribution to the knowledge of the ecogenetics of this species on the Colombian Pacific, which included analyses of genetic diversity, morphological variability, and environmental factors in the localities of Virudó, Charambirá, Isla La Plata, Tumaco, Milagros, and Chontal (Colombia). The genetic variation and population structure analyses of *P. rhizophorae* were carried out using AFLP in fifty-seven individuals from the six localities. In total, 225 fragments were produced, of which 155 (69%) were polymorphic. The genetic diversity within populations varied significantly, with the lowest levels of within-population variation in La Plata Island and Tumaco; and the highest level of variation ( $H_{ep} = 0.187$ ) in Chontal. This study showed that *P. rhizophorae* was significantly structured ( $\phi_{st} = 0.2654$ ) with 73.5% of the variation within populations, which is evidence of sub-structure within populations. Genetic differentiation was not related to the geographic distance between zones. This suggests that the population dynamics of *P.*

<sup>1, 2, 3</sup> Sección de Genética, Departamento de Biología, Universidad del Valle. A. A 25360. Cali (Valle del Cauca), Colombia. Correos electrónicos: <sup>1</sup> <mfcastil@univalle.edu.co>, <sup>2</sup> <nelstoro@univalle.edu.co>, <sup>3</sup> <hecarden@yahoo.es>

*rhizophorae* is associated with historical processes influenced by ecological- environmental factors. The study of morphological variability showed that the best development of the trees is in Virudó, a locality dominated by riverine mangroves. In contrast, mangroves of Tumaco, Milagros, and Charambirá showed a lower phenotypical development. The composition of soil around *P. rhizophorae* was homogeneous, with most localities with very fine sands and clays, being Tumaco the exception with clays and thick and fine sands. Interstitial salinity levels showed low variation among localities with suitable values for the species survival.

*Key words:* AFLP, Colombia, genetic diversity, granulometry, morphology, Pacific coast, *Pelliciera rhizophorae*, population structure.

## INTRODUCCIÓN

En Colombia, ocho especies de manglar se encuentran distribuidas a lo largo de las costas Atlántica y Pacífica ocupando 379.954 ha de bosque (Sánchez-Páez et al., 2000). En el Pacífico colombiano, los bosques de manglar abarcan una extensión de 279.724 ha ocupando una banda continua de bosque, con algunos parches ubicados hacia el norte del país (Casas-Monroy, 2000). Una de las especies que hace parte del ecosistema manglar del Pacífico colombiano es *Pelliciera rhizophorae*, conocida comúnmente como mangle piñuelo. Esta especie es única conocida actualmente del género *Pelliciera* en la costa colombiana, se encuentra casi restringida a la costa del Pacífico americano entre el golfo de Nicoya (Costa Rica) y el río Esmeraldas (Ecuador) (Jiménez, 1984; Tomlinson, 1986). Aunque en el período terciario estuvo ampliamente distribuida por la costa caribe, en el presente se han reportado pequeñas poblaciones de esta especie en Nicaragua, Panamá y Colombia (Jiménez, 1984). Las observaciones de campo sugieren que la reducción en el rango de distribución de esta especie en el Caribe, puede ser debida a cambios climáticos y a cambios en el nivel del mar ocurridos a finales del Eoceno, los cuales ocasionaron drásticas alteraciones en la salinidad y en la estabilidad del suelo. Dichas alteraciones y la competencia con especies del género *Rhizophora*, podrían explicar la notable reducción de *Pelliciera* en los manglares del caribe después del Eoceno (Jaramillo y Bayona, 2000; Jiménez, 1984; Rull 1998). Hasta el momento, los trabajos desarrollados en esta especie, se han encaminado principalmente a conocer su morfología

(Cantera y Arnaud 1997; Prah 1987), ecología y fisiología (Prah et al., 1990) y distribución geográfica (Calderón, 1984; Jaramillo y Bayona, 2000; Jiménez 1984), y no se ha reportado ningún estudio en el campo de la biodiversidad.

Los criterios actuales en biología de la conservación plantean la necesidad de adquirir conocimientos sobre la biodiversidad de las especies. En este sentido, marcadores moleculares como los AFLP son herramientas útiles para medir los niveles de variación genética dentro de una especie, ya que permiten evaluar un alto número de *loci* dentro del genoma de la especie, con el fin de detectar las diferencias entre los organismos a nivel molecular (Crouch et al., 2000; Rivera et al., 2002). Desde una perspectiva más amplia, Frankel et al. (1995) consideran importante integrar los estudios genéticos con la ecología, lo cual se puede globalizar en el término “ecogenética”. Los estudios en ecogenética de poblaciones naturales, permiten evaluar el factor genético y ambiental en la constitución de los organismos, lo cual proporcionará los elementos básicos para proponer futuros programas de conservación más adecuados.

Este trabajo, pionero en el estudio ecogenético de *P. rhizophorae*, aporta información a cerca de su variabilidad genética y morfológica en la costa del Pacífico colombiano, lo cual, junto con el análisis de algunos factores ambientales, nos revela preliminarmente, el estado actual de las poblaciones de esta especie. Dicha información podrá ser útil para llevar a cabo nuevos estudios a nivel microgeográfico o a escalas más amplias, explorando otras pobla-

ciones dentro del rango de distribución de la especie; con el fin de que en un futuro se puedan establecer criterios adecuados para conservación y uso sostenible de este recurso.

**MATERIALES Y MÉTODOS**

**Material vegetal.** Se colectó tejido foliar de 57 individuos de la especie *P. rhizophorae* en seis localidades ubicadas a lo largo de la costa del Pacífico colombiano, clasificadas dentro de los dife-

rentes tipo de manglar de acuerdo a los factores ambientales que influyen cada zona: Virudó (Chocó), Charambirá (Chocó), Isla La Plata (Valle del Cauca), Tumaco (Nariño), Milagros (Nariño) y Chontal (Nariño) (tabla 1; figura 1). El muestreo se realizó en transectos paralelos a la costa, con una distancia mínima de 50 m entre árboles. Se muestrearon por localidad entre 8 y 10 individuos. El material vegetal colectado fue preservado en Sílica gel con indicador de cobalto, posteriormente se maceró y almacenó a -80 °C hasta su utilización.

**Tabla 1.** Posición geográfica, tamaño de la muestra y heterocigosidad promedio esperada para las poblaciones de *P. rhizophorae* en la costa del Pacífico colombiano utilizando el estimador no sesgado de Lynch y Milligan (1994)

Poblaciones	Latitud	Longitud	N	Heterocigosidad promedio esperada (Desviación estándar)
La Plata	4° 1' 60" N	77° 15' 0" O	9	0,081 (0,179)
Virudó	5° 24' 0" N	77° 24' 0" O	10	0,111 (0,155)
Chontal	1° 31' 60" N	78° 52' 60" O	8	0,187 (0,145)
Milagros	1° 36' 0" N	79° 1' 0" O	10	0,131 (0,190)
Tumaco	1° 49' 0" N	78° 46' 0" O	10	0,090 (0,045)
Charambirá	4° 17' 60" N	77° 27' 0" O	10	0,103 (0,179)
<b>Población total</b>			<b>57</b>	<b>0,211 (0,030)</b>



**Figura 1.** Ubicación geográfica de las zonas de muestreo de la especie *P. rhizophorae* en el Pacífico colombiano

**Extracción de ADN.** A partir de 250 mg de tejido foliar deshidratado y macerado se llevó a cabo la extracción de ADN, utilizando el protocolo descrito por Parani et al. (1997), con algunas modificaciones. Brevemente, el protocolo empleado fue el siguiente: la lisis celular se realizó incubando por una hora el tejido a 60 °C en buffer con CTAB al 2% y b-mercaptoetanol al 0,1%. Posteriormente, se hicieron dos extracciones con un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó por 10 min a 4.000 rpm. El ADN fue precipitado utilizando 0,6 volúmenes de isopropanol y lavado en una solución de etanol al 76% y acetato de amonio al 10 mM. Por último, el ADN fue disuelto en una solución de Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM y EDTA 1 mM. El ARN fue degradado después de la incubación a 37 °C durante 30 min con 50 ng/ml de

RNAse. La calidad y la cantidad del ADN se evaluó por electroforesis en geles de agarosa al 0,8% y por fluorometría, respectivamente.

**Análisis de AFLP.** El análisis de AFLP fue realizado según el procedimiento descrito por Vos et al. (1995), utilizando el Kit "AFLP System I" (Cat # 10544-013) y el "AFLP Starter Primer Kit" (Cat # 10483-014) de GIBCO-BRL Products, LIFE TECHNOLOGIES. Se utilizó un total de 250 ng de ADN genómico, el cual fue digerido con enzimas de restricción EcoRI y MseI a 37 °C por 2 h en un volumen de 12,5 ml de reacción. Los fragmentos obtenidos después de la digestión fueron ligados a secuencias adaptadoras en presencia de ADN-ligasa de T4, mediante incubación a 20 °C por 2 h. El ADN digerido y ligado se diluyó en una proporción 1:10, la cual se empleó en el proceso de amplificación preselectiva (PCR+1), realizada en un volumen de 25 ml y 20 ciclos de amplificación a 94 °C

por 30 s, 56 °C por 60 s y 72 °C por 60 s. Los productos de la preselección fueron diluidos en una proporción 1:50 y se realizó una amplificación selectiva (PCR+3), empleando cuatro combinaciones de cebadores EcoRI y MseI (tabla 2). La reacción de amplificación selectiva se realizó en un volumen de 20 ml, bajo las siguientes condiciones: un ciclo a 94 °C por 30 s, 65 °C por 30 s y 72 °C por 60 s, seguido por 12 ciclos, con disminución en la temperatura de "annealing" de 0,7 °C en cada ciclo y por último, se realizaron 23 ciclos a 94 °C por 30 s, 56 °C por 30 s y 72 °C por 60 s. Los fragmentos amplificados fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes de 6% con urea 7 M, empleando el sistema Sequi-Gen GT BIORAD 38 x 50 cm a 80 W, 50 °C por 4 h. La visualización de los fragmentos se realizó con nitrato de plata según el protocolo descrito por Bassam et al. (1991) y el tamaño se determinó con un marcador de peso molecular de 25 bp (GIBCO BRL.).

**Tabla 2.** Combinación de cebadores AFLP empleados para el análisis de diversidad genética de *P. rhizophorae* en el Pacífico colombiano

Combinaciones de cebadores de AFLP	N.º total de fragmentos amplificados	N.º total de fragmentos polimórficos	Porcentaje de polimorfismo (% (* promedio))
E(AAC)/M(CAG)	73	41	56
E(ACA)/M(CTT)	52	41	79
E(ACC)/M(CAG)	32	22	69
E(AGC)/M(CTA)	68	51	75
<b>Total</b>	<b>225</b>	<b>155</b>	<b>69*</b>

**Análisis de datos genéticos.** Antes de evaluar la población total se realizaron ensayos preliminares con 10 de las 64 combinaciones de cebadores proporcionadas por el "AFLP starter primer kit" de GIBCO BRL., a partir de estos ensayos, se seleccionaron las cuatro combinaciones más polimórficas según el criterio de Lynch y Milligan (1994) (tabla 2). Los datos obtenidos con cada combinación fueron registrados en una matriz de 0 y 1 para denotar ausencia y presencia del fragmento en cada *locus*.

Todos los *loci* fueron incluidos en el análisis poblacional.

La diversidad genética fue estimada en términos de la heterocigosidad promedio esperada ( $\bar{H}_e$ ), utilizando la expansión de Taylor (Lynch y Milligan, 1994) para calcular las frecuencias alélicas, ya que el carácter dominante de los AFLP no permite diferenciar directamente los homocigotos dominantes de los heterocigotos. Mediante el programa TFPGA

1.3 (Miller, 1997), se calcularon las medidas de distancia genética empleando el estimador no sesgado de Nei (1978), las cuales se utilizaron para construir un dendrograma con el método de agrupamiento UPGMA, posteriormente, sometido a un análisis de «*bootstrap*» con 1.000 permutaciones para verificar la consistencia de los agrupamientos.

La estructura poblacional fue evaluada mediante el Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) (Excoffier et al., 1992) con dos niveles de jerarquía, entre y dentro de poblaciones, utilizando el programa WINAMOVA versión 1,55 (Excoffier, 1992), a partir de las medidas de distancia obtenidas utilizando el coeficiente de apareamiento simple en el programa AMOVA-PREP (Miller, 1998). Para medir la diferenciación genética entre poblaciones se empleó el estimador  $\phi_{st}$  (Excoffier et al., 1992), equivalente al  $F_{st}$  de Wright (1951), ya que el  $\phi_{st}$  permite eliminar sesgos en la medida de diferenciación cuando se emplean marcadores de tipo dominante como los AFLP. La tasa de migración efectiva por generación ( $N_e m$ ) fue calculada a partir de los valores  $\phi_{st}$  mediante la ecuación propuesta por Wright (1951):  $N_e m = (1-F_{st})/4F_{st}$ . Para determinar si existía correlación entre la distancia genética no sesgada de Nei (1978) y las distancias geográficas entre zonas, se empleó la prueba de Mantel (1967). El programa TFPGA (Miller, 1997), utilizado para este análisis, permitió calcular el coeficiente de correlación ( $r$ ) y el valor de  $P$  a dos colas, el cual fue determinado con 999 permutaciones.

Para el estudio morfométrico, se evaluaron entre 25 y 30 individuos por cada zona (excepto para Chontal donde se colectaron 8 individuos de la especie), para un total de 152 y se registraron las medidas de largo y ancho de las hojas, el diámetro a la altura del pecho (D. A. P.), calculada a partir de la medición del perímetro del tronco mediante la aproximación geométrica:  $\text{perímetro} = 2\pi r$  y la altura de los árboles, medida con la ayuda de un clinómetro aplicando el teorema de Pitágoras. Los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico SPSS versión 9,0 (SPSS Inc. 1999). Para

cada uno de los caracteres se realizó el análisis descriptivo por población, el cual incluyó la media y la desviación estándar. Posteriormente, se realizó un análisis exploratorio de los datos aplicando la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y la prueba de homogeneidad de varianzas mediante el estadístico de Levene (Zar, 1996). Los datos que no se ajustaron a la distribución normal, fueron transformados utilizando el logaritmo en base 10. El análisis paramétrico de los datos fue realizado mediante el ANOVA en una vía, con un nivel de significancia de 5%, seguido de una prueba de comparación múltiple. En este último caso, la diferencia mínima significativa (D. M. S) fue empleada para obtener agrupaciones entre poblaciones cuyas medidas promedio no diferían en un valor superior al valor crítico de la D. M. S.

El estudio de factores ambientales incluyó el análisis de las partículas granulométricas del suelo de anclaje de *P. rhizophorae*, para lo cual se colectaron muestras de suelo de la plataforma costera de las localidades de Virudó, Charambirá, Isla La Plata, Tumaco, Milagros y Chontal. Las muestras de suelo fueron deshidratadas en un horno a 110 °C, trituradas con la ayuda de un molino y posteriormente, 100 gr de este sustrato seco se sometieron a un proceso de tamizaje; empleando seis mallas dispuestas en orden descendente con diámetros de poro entre 681,8 y 79,05 mm, los cuales permitieron la separación de partículas de suelos arenosos, según la escala de grado de Wentworth (1922). La salinidad en cada zona fue medida intersticialmente utilizando un refractómetro, el cual registró la concentración de sales disueltas en el agua en partes por mil (ppm).

## RESULTADOS

Con cuatro combinaciones de cebadores AFLP se obtuvo un total de 225 fragmentos amplificados (media  $\pm$  DE,  $57 \pm 15$  fragmentos por combinación de cebadores), 155 (69%) polimórficos para la población total (tabla 2). El porcentaje de

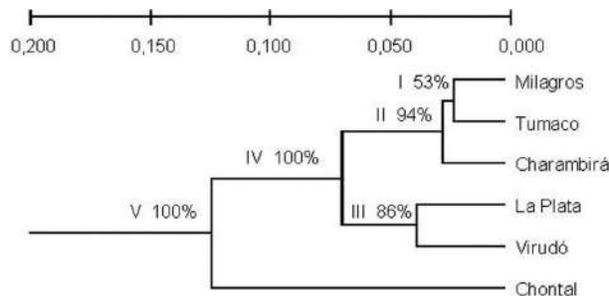
polimorfismo por combinación de cebadores estuvo entre 56 y 79%, incluyendo en el análisis fragmentos entre 100 y 450 pb de tamaño.

**Diversidad genética.** La diversidad genética ( $\bar{H}_c$ ) mostró un valor de  $0,211 \pm 0,030$  para la población total analizada. Dentro de poblaciones ( $\bar{H}_{ep}$ ), los niveles de diversidad genética estuvieron entre 0,081 y 0,187 (tabla 1), detectando diferencias altamente significativas entre los valores estimados ( $P < 0,001$ ). Se encontró que Isla La Plata y Tumaco presentaron los niveles más bajos de diversidad intrapoblacional ( $\bar{H}_{ep} = 0,081$  y  $0,090$ , respectivamente), mientras que Chontal resultó ser la población más diversa genéticamente con un valor de  $\bar{H}_{ep} = 0,187$  (tabla 2).

El dendrograma (figura 2) construido a partir de la distancia genética calculada entre pares de poblaciones, utilizando el índice de distancia no sesgado de Nei (1978), determinó la presencia de dos grupos principales de poblaciones. En uno de los grupos se ubica Chontal separada de las otras cinco poblaciones a 0,124 de distancia (nodo V) con 100% de consistencia y todos los *loci* apoyando el distanciamiento de esta población. La segunda agrupación (nodo IV), se divide a su vez en dos subgrupos unidos a 0,070 de distancia: el primer subgrupo (nodo I) une las poblaciones de Milagros y Tumaco a 0,024 de distancia y Charambirá (nodo II) se une a Milagros y Tumaco con una distancia internodal corta, con 51,11% de los *loci* dando soporte a este agrupamiento. El segundo subgrupo (nodo III) está integrado por las poblaciones de Isla

La Plata y Virudó, las cuales se unen al 0,039 de distancia con 15,56% de los *loci* apoyando este grupo (figura 2).

**Estructura poblacional.** El análisis molecular de varianza (AMOVA) reveló una estructuración poblacional altamente significativa entre poblaciones (26,54%,  $P < 0,001$ ), además de una alta variación a nivel intrapoblacional (73,46%) (tabla 3). El grado de diferenciación entre pares de poblaciones estimado a partir de los  $\phi_{st}$  mostró que la mayoría de las poblaciones se encuentran significativamente diferenciadas ( $P < 0,001$ ) con valores entre 0,122 y 0,498 (tabla 4), con excepción de Milagros-Charambirá, para las cuales el valor de diferenciación fue de 0,105 y  $P < 0,05$ . Esta baja diferenciación entre Milagros y Charambirá, estuvo de acuerdo con la tasa más alta de flujo de migrantes por generación ( $N_e m = 2,1$ ) (tabla 4), lo cual sugiere que estas dos poblaciones mantienen intercambio genético que ha evitado una diferenciación genética considerable a través del tiempo.



**Figura 2.** Dendrograma obtenido mediante el método de agrupamiento UPGMA, a partir de las distancias genéticas de Nei (1978). Los valores sobre los nodos indican la consistencia de los agrupamientos con 1.000 permutaciones

**Tabla 3.** Análisis de varianza molecular (AMOVA) para 57 individuos de *P. rhizophorae* colectados en seis poblaciones de la costa del Pacífico colombiano

Fuente de variación	g. l.	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Componente de varianza	Total %	Valor de P
Entre poblaciones	5	165,4	33,1	2,7	26,5	< 0,001
Dentro de poblaciones	51	380,5	7,5	7,5	73,5	

**Tabla 4.** Valores de  $\phi_{st}$  y tasa efectiva de migración ( $N_e m$ ) estimados entre pares de poblaciones de *P. rhizophorae*. Los valores sobre la diagonal corresponden a  $N_e m$

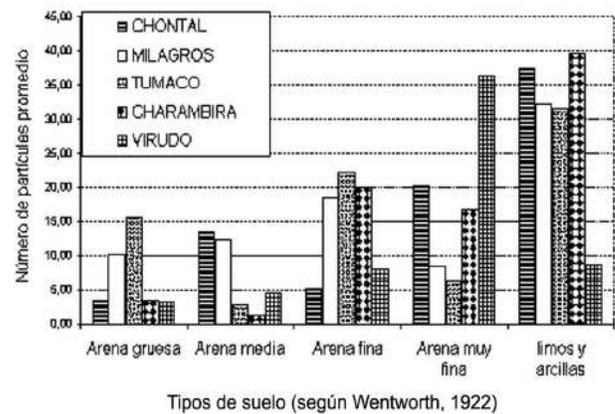
Poblaciones	La Plata	Virudó	Chontal	Milagros	Tumaco	Charambirá
La Plata	-	1,4	0,5	0,6	0,4	0,3
Virudó	0,156 ***	-	0,6	0,9	1,1	0,4
Chontal	0,329 ***	0,299 ***	-	1,3	0,6	0,7
Milagros	0,301 ***	0,222 ***	0,165 ***	-	1,8	2,1
Tumaco	0,372 ***	0,188 ***	0,284 ***	0,122 ***	-	0,7
Charambirá	0,498 ***	0,388 ***	0,255 ***	0,105 *	0,276 ***	-

No se encontró correlación significativa entre las distancia genéticas y las distancias geográficas que separan las zonas de estudio, según lo reveló la prueba de Mantel ( $r = -0,18$ ;  $0,224 < P < 0,778$ ). Por lo tanto, se pueden encontrar poblaciones tan distantes como Charambirá y Milagros con flujo génico frecuente ( $N_e m \approx 2$ ) y poblaciones cercanas como Isla La Plata y Charambirá con  $N_e m \ll 1$ .

**Variabilidad morfológica entre poblaciones de *P. rhizophorae*.** Una descripción del comportamiento de cada uno de los cinco caracteres morfométricos en las seis localidades evaluadas se resume en la tabla 5. El análisis exploratorio de los datos morfométricos mostró normalidad para los datos medidos en las hojas. Los datos de altura del árbol y D. A. P fueron normalizados mediante una transformación logarítmica. El ANOVA en una vía (tabla 6) reveló diferencias altamente significativas para los caracteres de largo y ancho de las hojas, proporción largo/ancho de las hojas y altura del árbol. Estos cuatro caracteres sometidos a la prueba de comparación múltiple D. M. S, produjo agrupamientos entre poblaciones, los cuales se muestran en la tabla 5.

**Características granulométricas y salinidad en el sustrato de *P. rhizophorae*.** La composición granulométrica del suelo en las zonas de Virudó, Chontal, Milagros y Charambirá, reve-

ló que en su mayoría el sustrato para el establecimiento de *P. rhizophorae* está constituido por arcillas y arenas muy finas principalmente en Virudó. En Tumaco, una porción de arenas gruesas, arenas finas y arcillas forman parte del suelo en esta zona, mostrando una alta heterogeneidad en la composición de sedimentos. La figura 3 muestra la distribución de partículas en el suelo de cada zona, de acuerdo a la clasificación de partículas de Wentworth (1922).

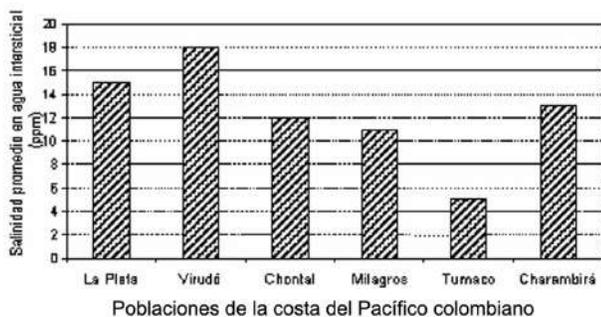


**Figura 3.** Histograma de frecuencias que muestra la composición granulométrica del suelo de *P. rhizophorae* en cinco zonas de la costa del Pacífico colombiano

La salinidad registrada entre las seis zonas mostró una ligera variación (figura 4), pero en todos los casos permitió determinar que el agua intersticial en el suelo de anclaje de *P. rhizophorae* es salobre, con valores promedio entre los 5 y 18 ppm.

**Tabla 5.** Estadística descriptiva de los caracteres morfométricos y agrupamientos entre poblaciones según la D. M. S. (\* no se detectaron diferencias significativas para este carácter)

Carácter morfométrico	Población	N	Medida promedio	Desviación estándar	Agrupación según D. M. S.
Largo de las hojas	Virudó	30	15,88 cm	2,35	I
	Tumaco	26	14,16 cm	4,11	II
	Milagros	29	13,94 cm	1,96	II
	Chontal	8	13,79 cm	1,95	II
	Charambirá	29	12,80 cm	1,76	III
	Isla La Plata	30	12,42 cm	1,58	III
Ancho de las hojas	Virudó	30	3,97 cm	0,43	I
	Chontal	8	3,50 cm	0,50	II
	Isla La Plata	30	3,49cm	0,48	II
	Tumaco	26	3,42 cm	0,47	II
	Milagros	29	3,40 cm	0,94	II
	Charambirá	29	3,19 cm	0,54	II
Proporción largo/ancho de las hojas	Milagros	29	4,33 cm	0,64	I
	Tumaco	26	4,17 cm	1,00	I
	Charambirá	29	4,07 cm	0,52	I
	Virudó	30	4,03 cm	0,53	I
	Chontal	8	4,01 cm	0,52	I
	Isla La Plata	30	3,61 cm	0,42	II
Altura del árbol	Chontal	8	14,14 m	5,95	I
	Virudó	30	1,26 m	5,06	I
	Isla La Plata	30	8,61 m	3,73	II
	Milagros	29	7,56 m	4,13	II
	Charambirá	29	7,36 m	5,51	II
	Tumaco	26	7,33 m	3,62	II
D. A. P.	Isla La Plata	30	14,36 cm	11,67	*
	Virudó	30	10,49 cm	5,18	*
	Chontal	8	13,29 cm	5,87	*
	Milagros	29	9,24 cm	6,80	*
	Tumaco	26	9,38 cm	6,50	*
	Charambirá	29	12,61 cm	7,27	*



**Figura 4.** Salinidad (ppm) promedio en el agua intersticial del suelo de *P. rhizophorae* en las seis zonas de la costa del Pacífico colombiano

## DISCUSIÓN

**Diversidad genética y estructura poblacional de *P. rhizophorae* de la costa del Pacífico colombiano.** *Pelliciera rhizophorae*, especie que hasta el momento se considera típicamente neotropical en origen y distribución (Rull, 1998), fue una de las más importantes entre los manglares del Eoceno (~ 50 ma). Sin embargo, los cambios climáticos ocurridos durante el Oligoceno (~ 33 ma) llevaron a su paulatina reducción y actual-

mente se encuentra restringida casi completamente a un rango estrecho en el Pacífico americano (Jiménez, 1984; Rull, 1998). A pesar de la reducción en su distribución geográfica, nuestro estudio reveló que esta especie presenta niveles altos de diversidad genética ( $\bar{H}_e = 0,211 \pm 0,030$ ) compa-

rables con los obtenidos en una especie de mangle ampliamente distribuida como *Avicennia germinans*, la cual ha registrado valores de heterocigosidad promedio de 0,25 (Cerón, 2002) y 0,20 (Dodd et al., 2002) utilizando marcadores moleculares AFLP.

**Tabla 6.** Análisis de varianza en una vía (ANOVA) para los cinco caracteres morfométricos registrados en 152 individuos de *P. rhizophorae* (\*\*\*) valor de P altamente significativo)

Caracteres		S. C.	C. M.	F	Valor de P
Largo de las hojas	Entre poblaciones	218,409	43,682	7,396	0,000 ***
	Dentro de poblaciones	862,347	5,906		
	total	1.080,756			
Ancho de las hojas	Entre poblaciones	9,748	1,950	5,326	0,000 ***
	Dentro de poblaciones	53,442	0,366		
	total	63,190			
Proporción largo/ancho de las hojas	Entre poblaciones	8,554	0,1711	4,212	0,001 ***
	Dentro de poblaciones	59,295	0,406		
	total	67,848			
Altura	Entre poblaciones	1,214	0,243	4,927	0,000 ***
	Dentro de poblaciones	7,145	0,049		
	total	8,359			
D. A. P.	Entre poblaciones	0,757	0,151	1,884	0,101
	Dentro de poblaciones	11,65	0,080		
	total	12,41			

La diversidad genética intra poblacional mostró los niveles más bajos en Tumaco e Isla La Plata, lo cual podría deberse al efecto de la intervención del hábitat en dichas zonas. De acuerdo con Parani et al. (1997), la degradación del hábitat es un factor determinante en la pérdida de diversidad genética en especies de ecosistemas costeros como los manglares. Al respecto, Guevara et al. (1998), reportaron la incidencia de eventos drásticos de contaminación con hidrocarburos en las costas de Tumaco. Además de esto, las intensas actividades turísticas e industriales que se desarrollan en la zona, podrían estar ocasionando deterioro genético en esta especie y posiblemente en las otras especies de manglar que integran el ecosistema. Por su parte, en Isla La Plata (Bahía Málaga), se reportan los niveles más bajos de intervención (S. A. F., 1995), por lo tanto

se podría sugerir que la disminución de la diversidad genética en la zona, está condicionada por otros factores, como la retención local de propágulos al interior de Bahía Málaga, donde posiblemente ocurren bloqueos en la circulación de agua por masas de tierra (islas), lo que podría impedir el desplazamiento de los propágulos hacia localidades vecinas. Casos similares fueron propuestos por Maguire et al., (2000) para *Avicennia marina* y Dodd et al. (2002) para *A. germinans*, donde se detectaron bajos niveles de diversidad genética en poblaciones que presentaron restricción en el movimiento de los propágulos, lo cual llevó a la formación de demos locales con altas tasas de endogamia. Por otra parte, Chontal mostró un alto nivel de diversidad y distanciamiento genético de las otras localidades evaluadas (figura 2). Esto podría evidenciar

el intercambio genético más frecuente de esta población con otras ubicadas hacia el sur en la Bahía de Ancón de Sardinas (Ecuador), probablemente debido a la influencia de corrientes marinas que circulan al interior de esta bahía.

El sistema de apareamiento es un factor biológico que está relacionado con la distribución de la diversidad genética en las especies de manglares (Ge y Sun, 1999), sin embargo, hasta el momento es poco el conocimiento que se tiene a cerca de la biología reproductiva de estas especies. A pesar de no contar con datos concretos a cerca del tipo de apareamiento en *P. rhizophorae*, se puede inferir que es alógama, teniendo en cuenta los altos niveles de variación genética intrapoblacional encontrados en este estudio (73,46%). Resultados similares han sido reportados por Hamrick y Godt (1989) y Loveless y Hamrick (1984), con especies de plantas tropicales predominantemente alógamas, donde se detectó una variación intrapoblacional que supera el 70%.

Un alto grado de variación en las frecuencias alélicas de los *loci* evaluados, indica que *P. rhizophorae* en el Pacífico colombiano no está constituida por una sola unidad panmíctica; es decir, presenta estructuración. Al parecer, la estructura poblacional de la especie no está determinada por la distancia geográfica entre zonas y se propone que está constituida por tres grupos: **1)** Isla La Plata- Virudó; **2)** Milagros-Tumaco-Charambirá y; **3)** Chontal. Según la interpretación de Wright (1978), un valor de  $\phi_{st} > 0,25$  indica que las poblaciones evaluadas de *P. rhizophorae* presentan una fuerte estructuración sin aislamiento genético.

La estructura genética de *P. rhizophorae* en el Pacífico colombiano, podría involucrar diferentes procesos ocurridos a través del tiempo debido a la influencia de factores ecológicos y ambientales, los cuales probablemente están determinando la distribución de la diversidad genética actual de la especie. Algunos factores ecológicos y ambientales al parecer involucrados en la diná-

mica poblacional del mangle piñuelo, se discuten seguidamente.

Primero, el movimiento de polen mediado por aves. Las observaciones de campo han permitido identificar al colibrí de la especie *Amazilia tzacatl* como el único polinizador de esta especie (Gutiérrez et al., 1988; Prah, 1987) en el Pacífico colombiano. Debido al comportamiento territorial y las áreas de forrajeo tan reducidas que utiliza el colibrí (Gass y Montgomerie, 1981), una restricción en el movimiento del polen podría favorecer una alta diferenciación intrapoblacional como al parecer ocurre en *P. rhizophorae*.

Un segundo factor, el desplazamiento de propágulos a través de corrientes marinas superficiales. Para diversas especies de hábitat acuático, se ha propuesto que un mecanismo de dispersión de semillas ó propágulos mediado por corrientes de agua, puede asegurar el intercambio de migrantes a través de largas distancias (Cain et al., 2000; Kudoh y Whigham, 2001; Rivera et al., 2002). Si se propone que este mecanismo está implicado en el intercambio genético entre poblaciones de *P. rhizophorae* a lo largo de la costa del Pacífico colombiano, podría pensarse en la Corriente de Colombia (Corriente de Humboldt) como posible mediador del desplazamiento de propágulos. Sin embargo, para asegurar que la dispersión de los propágulos lleva al establecimiento exitoso de las poblaciones de *P. rhizophorae*, deben considerarse algunas características fisiológicas y morfológicas de los propágulos como el período de flotación y la longevidad. En ensayos realizados con varias especies de mangle (Rabinowitz, 1978), encontró que los propágulos de *P. rhizophorae* pueden conservar su viabilidad y flotabilidad por un período aproximado de 70 días, aunque también se debe considerar la velocidad de las corrientes de agua para determinar la distancia de dispersión de los propágulos y comprender el mecanismo de intercambio genético entre poblaciones distantes como Milagros y Charambirá. Todo esto sugiere que posibles eventos de colonización paulatinamente es-

calonada hayan disminuido la diferenciación genética entre poblaciones distantes.

Finalmente, el factor de la distribución espacial de hábitats favorables, el cual está asociado de manera directa con las características fisiológicas de la planta que determinan el límite de tolerancia a las condiciones del hábitat. En el caso de *P. rhizophorae*, los estudios sugieren que las concentraciones de sal y la estabilidad del suelo, pueden restringir el establecimiento de las poblaciones (Jiménez, 1984). Una vez que los propágulos han alcanzado un sitio con las condiciones óptimas para su desarrollo, la depredación puede reducir el éxito en el establecimiento de las poblaciones; según Smith et al. (1989), este un factor determinante en la estructuración de los manglares.

**Influencia de los factores ecológicos en la variabilidad morfológica de *P. rhizophorae* en el Pacífico colombiano.** En la costa del Pacífico colombiano, los bosques de manglar han sido clasificados como manglares de ribera, borde y barra, de acuerdo con el desarrollo estructural que presenta el bosque como respuesta a diversos factores ambientales, siendo más desarrollado el de ribera y con menor desarrollo el de borde (Cantera y Blanco, 2001; Prah et al., 1990). Entre las poblaciones incluidas en nuestro estudio se clasifican como manglares de ribera los bosques muestreados en las localidades de Virudó, Milagros, Tumaco y Charambirá. De estas cuatro localidades, Virudó mostró el mejor desarrollo para un manglar de ribera, encontrando que las medidas promedio de los caracteres morfológicos de los árboles de esta localidad mostraron los valores más altos (tabla 5). En contraste, Tumaco, Milagros y Charambirá también constituidos por manglares ribereños, mostraron un menor desarrollo. Estos resultados están de acuerdo con lo planteado por Prah et al. (1990), quienes reportan que los manglares en la zona de Tumaco se forman en bateas arenosas, expuestas a las mareas solo durante las “pujas”, y tienden a experimentar pérdida de nutrientes por arrastre de las

aguas lluvias, generando por consiguiente un bajo desarrollo de los manglares en esta zona. Para las zonas de Milagros y Charambirá no se han reportado fenómenos semejantes, por lo tanto se plantea la necesidad de realizar estudios a nivel microgeográfico que permitan dilucidar los fenómenos que han ocasionado la disminución en el desarrollo de los árboles. En Isla La Plata- Bahía Málaga, el manglar característico es de borde y se desarrolla sobre plataformas fuertemente bioerosionadas e influenciadas por las marea, siendo así, es de esperarse que los manglares en esta zona muestren un desarrollo disminuido debido a la poca disponibilidad de nutrientes (Prah et al., 1990). Esto pudiera explicar las bajas medidas promedio observadas en los caracteres morfométricos para esta zona (tabla 5).

Teniendo en cuenta que la composición granulométrica del suelo es un factor importante en el desarrollo de los manglares (Guevara et al., 1998), se puede sugerir que la tendencia a la homogeneidad en la composición de sedimentos que se encontró en Virudó, esté contribuyendo a un mejor desarrollo para los árboles en esta zona. Contrario a lo encontrado en Virudó, Tumaco mostró heterogeneidad en la composición granulométrica del suelo, con arenas gruesas, arenas finas y arcillas. Dicha heterogeneidad puede estar contribuyendo con la disminución en el desarrollo del bosque en esta zona. Otro factor que tiene incidencia en el desarrollo de la especie, es la salinidad, la cual se encontró dentro del límite óptimo (< 37 ppm) (Jiménez, 1984), cuando se midió en agua intersticial del suelo. Los valores de salinidad registrados entre localidades presentaron ligeras variaciones, seguramente por la influencia de mareas, el aporte de agua dulce de los ríos y las precipitaciones que pueden ocasionar fluctuaciones en la medida de salinidad en diferentes épocas del año.

**Recomendaciones para futuros estudios.** De manera general, se puede inferir que *P. rhizophorae* en la costa del Pacífico colombiano, no muestra indicios de deterioro en su composición genética. Sin

embargo, poblaciones como Isla La Plata y Tumaco, podrían requerir estudios más profundos a nivel ecogenético, que permitan determinar las causas de los bajos niveles de diversidad genética encontrados en nuestro estudio. En Tumaco, se puede inferir que el alto grado de intervención al que han estado expuestos los bosques de manglar (Cabrera y Reyna, 1997) debido a los grandes asentamientos humanos, ha generado dicho problema. Por lo tanto, se considera prioritario ejercer planes de monitoreo y restauración dentro de esta localidad, utilizando datos de genética de poblaciones como los obtenidos en este trabajo.

## REFERENCIAS

- Bassam BJ, Caetano-Anollés G, Gresshoff PM.** 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 196:80-83.
- Cabrera EE, Reyna JA.** 1997. *Evaluación por impacto de derrames en la Ensenada de Tumaco, comprobación de la efectividad de los planes de contingencia.* Boletín Científico del Centro Control Contaminación del Pacífico. Colombia.
- Cain ML, Milligan BG, Strand A.** 2000. Long-distance seed dispersal in plant populations. *American Journal of Botany*, 87:1217-1227.
- Calderon E.** 1984. Occurrence of the mangrove *Pelliciera rhizophorae* on the Caribbean coast of Colombia with biogeographical notes. *Bulletin of Marine Science*, 35:105-110.
- Cantera JR, Arnaud PM.** 1997. Structure et distribution des associations d'arbres de mangrove de deux baies de la cote Pacifique de Colombie: Malaga et Buenaventura. Pp. 245-285. En: Kjerfve B, Delacerda, Shilf D (eds.). *Mangrove ecosystem studies in Latin America and Africa.* UNESCO. Paris, France.
- Cantera JR, Blanco JF.** 2001. The estuary ecosystem of Buenaventura Bay, Colombia. Volumen 144, pp. 265-280. En: Seeliger U, Kjerfve B (eds.). *Ecological studies, coastal marine ecosystems of Latin America.* Springer-Verlag. Berlin, Alemania.
- Casas-Monroy O.** 2000. *Estado de los manglares en Colombia año 2000.* Informe técnico Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras (INVEMAR). Santa Marta, Colombia.
- Cerón I.** 2002. Estudio de la diversidad genética del mangle negro o iguanero (*Avicennia germinans* L.) de cuatro localidades ecológicamente diferentes de la costa Pacífica Colombiana. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. Universidad del Valle. Cali Valle del Cauca), Colombia.
- Crouch HK, Crouch JH, Madsen S, Vuylsteke DR, Ortíz R.** 2000. Comparative analysis of phenotypic and genotypic diversity among plantain landraces (*Musa* spp., ABB group). *Theoretical Applied in Genetics*, 101:1056-1065.
- Dodd RS, Rafii ZA, Kashani N, Budrick J.** 2002. Land barriers and open oceans: effects on gene diversity and population structure in *Avicennia germinans* L. (Avicenniaceae). *Molecular Ecology*, 11:1327-1338.
- Excoffier L.** 1992. *Analysis of molecular variance (AMOVA ver 1.55).* Genetics and Biometry Laboratory. Universidad de Geneva. Suiza.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM.** 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131:479-491.
- Frankel OH, Brown AH, Burdon JJ.** 1995. *The conservation of plant diversity.* Cambridge University Press. Cambridge, Reino Unido.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Colciencias (contrato 367-98, código 1106-09-509-98) y a la Universidad del Valle, por la financiación del proyecto “*Ecogenética de poblaciones de mangle del Pacífico colombiano*”, Fase I: “*Diferenciación molecular dentro y entre géneros de mangle de la costa del Pacífico colombiano.*” A las comunidades de las localidades de Isla La Plata, Virudó, Chontal, Milagros, Tumaco y Charambirá. A la bióloga Martha Sofía González de la Universidad de Nariño, por su colaboración durante los muestreos.

- Gass CL, Montgomerie RD.** 1981. Hummingbird foraging behavior: decision-making and energy regulation. Pp.159-199. *En:* Kamil AC, Sargent TD (eds.). *Foraging behavior: ecological, ethological and psychological approaches.* Garland STPM Press. Nueva York. E. U. A.
- Ge XJ, Sun M.** 1999. Reproductive biology and genetic diversity of a cryptoviviparous mangrove *Aegiceras corniculatum* (Myrsinaceae) using allozyme and intersimple sequence repeat (ISSR) analysis. *Molecular Ecology*, 8:2061-2069.
- Guevara OA, Sánchez H, Murcia GO, Bravo HE, Pinto F, Álvarez R.** 1998. *Conservación y uso sostenible de los manglares del Pacífico colombiano* Ministerio del Medio Ambiente, ACOFORE, OIMT. Santafé de Bogotá, Colombia.
- Gutiérrez AM, Arroyave MS, Londoño Y, Marín J.** 1988. Notas preliminares sobre la polinización del mangle piñuelo *Pelliciera rhizophorae* en la costa Pacífica colombiana. Pp. 485-487. *En:* Varios (eds.). *Memorias del VI Seminario Nacional de Ciencias del mar.* Colombia.
- Hamrick JL, Loveless MD.** 1989. The genetic structure of tropical tree populations: associations with reproductive biology. Pp. 129-146. *En:* Bock JH, Linhart YB (eds.). *The evolutionary ecology of plants.* Westview Press. Boulder (Colorado), E. U. A.
- Hamrick JL, Godt MJW.** 1989. Allozymes diversity in plant species. Pp. 43-63. *En:* Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS (eds.). *Plant population genetics, breeding and genetic resources.* Sinauer Associations Inc. Sunderland (Massachusetts), E. U. A.
- Jaramillo C, Bayona G.** 2000. Mangrove distribution during the Holocene in Tribugá Gulf, Colombia. *Biotropica*, 32:14-22.
- Jiménez JA.** 1984. A hypothesis to explain the reduced distribution of the mangrove *Pelliciera rizophorae* Tr. y Pl. *Biotropica*, 16:304-308.
- Kudoh H, Whigham DF.** 2001. A genetic analysis of hydrologically dispersed seeds of *Hibiscus moscheutos* (Malvaceae). *American Journal of Botany*, 88:588-593.
- Loveless MD, Hamrick JL.** 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review in Ecology and Systematic*, 15:65-95.
- Lynch M, Milligan BG.** 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*, 3:91-99.
- Maguire TL, Saenger P, Baverstocks R.** 2000. Microsatellite analysis of genetic structure in the mangrove species *Avicennia marina* (Forsk.) Vierch. (Avicenniaceae). *Molecular Ecology*, 9:1853-1862.
- Mantel N.** 1967. The detection of disease clustering and a generalised regression approach. *Cancer Research*, 27:209-220.
- Miller MP.** 1997. *Tools for population genetic analysis, versión 1.3. A windows program for the analysis of allozymes and molecular population genetic data.* Department of Biological Sciences, Northern Arizona University. Flagstaff. Arizona, E. U. A.
- Miller MP.** 1998. *AMOVA-Prep 1.01. A program for the preparation of AMOVA input files from dominant marker raw data.* Department Biological Science. Northern Arizona University. Flagstaff (Arizona), E. U. A.
- Nei M.** 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89:583-590.
- Parani M, Lakshmi M, Etango S, Nivedita R, Anuratha CS, Parida A.** 1997. Molecular phylogeny of mangroves II. Intra-and interspecific variation in *Avicennia* revealed by RAPD and RFLP markers. *Genome*, 40:487-495.
- Prahl H von.** 1987. Notas sobre la historia natural del mangle piñuelo *Pelliciera rhizophorae* (Theaceae) en el Pacífico colombiano. *Actualidades Biológicas*, 15:117-122.
- Prahl H von, Cantera J, Contreras R.** 1990. *Manglares y hombres del Pacífico colombiano.* FEN-Editorial Presencia. Santafé de Bogotá, Colombia.
- Rabinowitz D.** 1978. Dispersal properties of mangrove propagules. *Biotropica*, 10:47-57.
- Rivera E, Aide TM, Mcmillan WO.** 2002. Patterns of genetic diversity and biogeographical history of the tropical wetland tree, *Pterocarpus officinalis* (Jacq.), in the Caribbean basin. *Molecular Ecology*, 11:675-683.
- Rull V.** 1998. Evolución de los manglares neotropicales: la crisis del Eoceno. *Interciencia*, 23:355-362.

- Sánchez-Páez H, Ulloa-Delgado G, Álvarez-León R, Gil-Torres WO, Sánchez-Alfárez AS, Guevara-Manceira OA, Patiño-Callejas L, Páez-Parra FE.** 2000. *Hacia la recuperación de los manglares del Caribe colombiano*. ProyectoPD/171/91 Rev. 2 (F). Fase II. Etapa II. Ministerio del Ambiente, ACOFORE, OIMT. Santafé de Bogotá, Colombia.
- S. A. F. (Servicio Ampliado del Fondo Monetario Internacional).** 1995. *Diagnóstico ecológico-ambiental y socio-económico del manglar de la costa Pacífica del departamento del Valle del Cauca*. Informe final Corporación Autónoma Regional del Cauca CVC/Sistemas agroforestales Ltda. Santiago de Cali (Valle del Cauca), Colombia.
- Smith TJ, Chan HT, McIvor CC, Robblee MB.** 1989. Comparisons of seed predation in tropical tidal forests from three continents. *Ecology*, 70:146-151.
- SPSS Inc.** 1999. *SPSS for windows Release versión 9.00 Standard Version*. Copyright SPSS Inc. Illinois, E. U. A.
- Tomlinson PB.** 1986. *The botany of mangroves*. Cambridge University Press. Cambridge, Reino Unido.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Lee T van de, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M.** 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23:4407-4414.
- Wentworth CK.** 1922. A scale of grade and class terms for clastic sediments. *Journal of Geology*, 30:377-392.
- Wright S.** 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 16:323-354.
- Wright S.** 1978. *Evolution and the genetics of populations, variability within and among natural populations*. Vol 4. University of Chicago Press. Chicago, E. U. A.
- Zar JH.** 1996. *Biostatistical Analysis*. Tercera Ed. Prentice Hall. Nueva Jersey, E. U. A.