

INSTITUTO TECNOLOGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGIA

INGENIERIA EN BIOTECNOLOGIA

INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACION

**EVALUACION DE MICROSATELITES PARA EL ANALISIS DE LAS
RELACIONES GENETICAS EN CLONES DE *Vochysia guatemalensis***

Fabiana Rojas Parajeles



CARTAGO, 2005

EVALUACION DE MICROSATELITES PARA EL ANALISIS DE LAS RELACIONES GENETICAS EN CLONES DE *Vochysia guatemalensis*

Fabiana Rojas Parajeles*

RESUMEN

En la actualidad, conservar nuestros recursos no es sólo una forma de proteger el ambiente y garantizar a las generaciones futuras un espacio apto para su desarrollo; sino también la manera de perpetuar las especies que ofrecen al hombre diferentes beneficios. Un problema en plantaciones forestales con la reforestación clonal, es la contaminación de los jardines clonales. Las investigaciones orientadas a garantizar la calidad de las plantaciones forestales son de suma importancia y por ello con éste estudio se pretende evaluar marcadores genéticos microsatélites (SSR) para dar apoyo al programa de mejoramiento genético y conservación de *Vochysia guatemalensis*, con la finalidad de asegurar y certificar la calidad de los clones. La validación de la técnica de microsatélites para la identificación clonal permitió descartar el imprimador A1-26, dado que no mostró amplificación. Los imprimadores A1-35 y A1-5 no se consideraron a la hora de realizar los distintos análisis dado que no hubo amplificación con muchas de las muestras. Se eligieron los imprimadores A1-20 y A1-15 con los que amplificaron la mayor cantidad de muestras, los cuales suministraron información valiosa para distinguir los genotipos de 33 clones. Con los datos se generó un dendrograma (UPGMA) y un análisis multivariado para conocer el agrupamiento de los clones (grado de parentesco). El análisis de agrupamiento permitió visualizar la separación de los clones en cinco grupos. Este resultado no coincidió con los resultados obtenidos por medio del análisis "Multidimensional Scaling" (MDS), donde los clones se separan en siete grupos. Según los análisis estadísticos y la elaboración de la huella genética, se observó que los clones pertenecientes a las muestras 7-9, 34-37 y 44-51-52-55 están genéticamente muy relacionados y podrían ser los mismos.

El valor de PIC promedio fue de 0,77 y el PIC de 0,83 para el locus A y de 0,72 para el locus C, lo cual evidencia el alto polimorfismo en estos dos loci analizados. Además, el alto valor de diversidad genética para el locus A (5,89) indica una alta variabilidad reflejada por el cálculo de las frecuencias alélicas.

A pesar de que solo se tomaron en cuenta dos imprimadores para los distintos análisis, se concluye que los cuatro loci estudiados presentan alto grado de polimorfismo, lo cual los hace marcadores apropiados para la identificación clonal.

DESCRIPTORES: *Vochysia guatemalensis*, microsatélites, reforestación clonal, mejoramiento genético, PCR.

*INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACION, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2005.

**EVALUACION DE MICROSATELITES PARA EL ANALISIS DE LAS
RELACIONES GENETICAS EN CLONES DE *Vochysia guatemalensis***

Informe Presentado a la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de
Costa Rica como requisito parcial para optar al título de Bachiller en
Ingeniería en Biotecnología

Miembros de Tribunal

Ingeniero Emanuel Araya Valverde, B.Sc.
Asesor-ITCR

Ingeniero Olman Murillo, Ph.D.
Asesor-ITCR

Biólogo Erick Hernández Carvajal, B.Sc.
Lector

DEDICATORIA

*A Dios por guiarme y darme la fortaleza para seguir siempre adelante.
A mis padres por hacer posible la conclusión de mis estudios superiores.
A mi novio por el apoyo y comprensión incondicional en todo momento.*

AGRADECIMIENTOS

La autora desea dejar constancia de su agradecimiento a los siguientes organismos y personas, por su colaboración en el presente trabajo:

Al Instituto Tecnológico de Costa Rica, a la Escuela de Ingeniería Forestal por el apoyo mostrado y al grupo de docentes de la Escuela de Biología por la formación académica impartida.

Al Dr. Olman Murillo por el apoyo financiero y logístico en la ejecución del proyecto.

Muy especialmente al Ingeniero Emanuel Araya por darme la oportunidad de trabajar a su lado y nutrirme de sus conocimientos, por su valiosa guía, sus aportes, consejos y constante cooperación durante la realización del proyecto.

A los funcionarios Gabriel Aguilar y Luis Castro del Laboratorio de Ecología-Genética de la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica, por el apoyo incondicional brindado sin ni siquiera conocerme, por compartir sus conocimientos, por su comprensión y sugerencias en las labores de laboratorio, pero por sobre todo por la humildad demostrada.

Al Bach. Erick Hernández por sus correcciones, sugerencias y confianza brindada durante mi formación universitaria, por ser una de las personas de quién más aprendí lecciones no solo académicas sino de la vida.

A mis amigos Patricia Daniels y José David Rojas por la compañía y ayuda durante los años de estudio.

A mis padres por haberme inculcado valores, principios y por ser las personas a quienes les debo lo que soy. Finalmente a mi novio Roy Araya por todo el amor, cariño, tolerancia y entendimiento demostrado en los momentos más difíciles de mi carrera.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
RESUMEN	i
ACREDITACION	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
TABLA DE CONTENIDO	v
INDICE DE CUADROS	vii
INDICE DE FIGURAS	viii
INDICE DE APENDICES	ix
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	
Objetivo General	5
Objetivo Específico	5
REVISION DE LITERATURA	
Descripción general de la especie	6
Marcadores genéticos	11
Marcadores moleculares	12
Aplicación de los marcadores moleculares en especies forestales	15
MATERIALES Y METODOS	
Obtención del material vegetal	17
Extracción de ADN de tejido vegetal (hojas) de <i>Vochysia guatemalensis</i>	17
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para los marcadores moleculares SSR	
<i>Evaluación Inicial</i>	18
<i>Optimización del protocolo de amplificación</i>	19
<i>Visualización de los productos de PCR</i>	22
Validación de la metodología de las SSR para la verificación de Clones	23
Análisis de datos de los SSR	24
RESULTADOS	27
DISCUSION	43

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	
Conclusiones	51
Recomendaciones	52
LITERATURA CITADA	53
APENDICES	59

INDICE DE CUADROS

Número	Título	Página
1	Imprimadores utilizados en el PCR para amplificar las secuencias simples repetidas (SSR)	21
2	Perfil térmico o condiciones de PCR para la amplificación de las SSR de los clones de <i>V. guatemalensis</i>	22
3	Mezcla de ABI 310 para Microsatélites de clones de <i>V. guatemalensis</i>	24
4	Posibles alelos observados en cada imprimador y su respectivo tamaño en pb al analizar 10 clones para la validación de la técnica de microsatélites mediante dos electroforesis distintas	32
5	Tamaño o peso molecular de los alelos identificados en cada locus y su promedio, al analizar los 62 clones mediante geles de poliacrilamida	35
6	Frecuencias alélicas de los loci A1-20 y A1-15	36
7	Elaboración de la huella genética para 33 clones de <i>V. guatemalensis</i> a partir de dos microsatélites	37
8	Matriz de distancia genética entre los clones que amplificaron con los loci A1-20 y A1-15	39
9	Distancia genética (Gregorius, 1974) de cada clon de <i>V. guatemalensis</i> con respecto al grupo de clones.	40

INDICE DE FIGURAS

Número	Título	Página
1	Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ADN total de los clones 102-3, 33-1, 41-3, 101-3, 200-4, 104-4, 120-6, 39-3, 19-8, 103-7 de <i>V. guatemalensis</i>	27
2	Electroforesis en gel de agarosa al 1% con productos de PCR a dos concentraciones distintas de MgCl ₂ .	28
3	Electroforesis en geles de acrilamida con productos de PCR de los cinco imprimadores con el clon # 101-3 a distintas temperaturas de apareamiento	30
4	Electroforesis en geles de acrilamida de la validación de la técnica de microsatélites en <i>V. guatemalensis</i> con dos brotes de un mismo	33
5	Dendrograma (UPGMA) basado en la matriz de distancia genética de los clones de <i>V. guatemalensis</i> que amplificaron con los loci A1-20 y A1-15	41
6	Análisis multivariado de ordenación “multidimensional scaling” de los clones de <i>V. guatemalensis</i> que amplificaron con los loci A1-20 y A1-15	42

INDICE DE APENDICES

Número	Título	Página
1	Número de muestra asignada a cada número de clon	59

INTRODUCCION

El Cebo (*Vochysia guatemalensis*) es una de las especies forestales nativas de la Zona Norte, localizada con frecuencia en potreros y áreas de regeneración natural. Conocida como Mayo blanco, Chanco, San Juan, Mayo, Palo de agua, Barbachele, Yemeri o Chanco blanco. Posee flores amarillas brillantes y llamativas en los meses de floración (entre marzo y junio). Es considerada una especie con excelente potencial para la reforestación, debido a su buena adaptación en condiciones abiertas de plantación, dónde presenta alta sobrevivencia y rápido crecimiento (COSEFORMA, 2001).

Vochysia ferruginea, por su parte es conocida como Botarrama, Chanco colorado o Mayo colorado. Es una de las especies nativas de Costa Rica más abundantes de la Zona Norte. Sus flores al igual que *Vochysia guatemalensis* son amarillas brillantes y su época de floración es en los meses de abril y mayo, periodo en el cual, éstas son llamativas. Características como rápido crecimiento y el hecho de ser una especie que coloniza sitios abandonados en forma natural, hacen que el hombre aproveche su madera y sea apta para reforestación (COSEFORMA, 1999).

El avance de la deforestación en los últimos años, ha llevado a varios países entre ellos Costa Rica al establecimiento de plantaciones forestales, esto debido a que el mercado de la madera se ha nutrido de bosques naturales para la obtención de ésta. Estas plantaciones además de suplir la demanda de madera y cumplir una función social y económica al ofrecer productos maderables con que trabajar, proveen beneficios ambientales como almacenaje de carbono, recuperación de suelos y restauración de la biodiversidad en tierras degradadas (Montagnini, 2004).

Debido a la gran importancia de éstas especies forestales en programas de reforestación, se plantea en Costa Rica a mediados de los años 90, lo que se conoce como reforestación clonal (Zeaser, 1996). La silvicultura clonal

plantea cambios en el modo de plantación, de manera que se logre una alta homogenización del cultivo. Así mismo para disminuir el riesgo de descenso en la variabilidad genética internacionalmente se ha instaurado como norma, el uso mínimo de 15 a 20 clones, cada uno en bloques monoclonales no mayores a 20 ha, esto para programas clonales comerciales (Zobel, 1993).

Dentro de este panorama la biotecnología, específicamente el campo de la biología molecular, ha permitido el desarrollo de marcadores genéticos. Los marcadores genéticos tienen diversas aplicaciones en la conservación y mejoramiento genético de distintas especies forestales (Araya *et al.*, 2005b). Generalmente un marcador genético se define como cualquier gen cuya expresión permite un efecto fenotípico que puede ser detectado fácilmente y puede ser utilizado para identificar transformantes individuales o su progenie. Además permite la identificación de individuos o células que contienen un determinado genotipo (Valadez y Kahl, 2000).

Los marcadores genéticos pueden ser morfológicos, bioquímicos y los basados en ADN o moleculares. El surgimiento de las enzimas de restricción y de la tecnología de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) ha permitido investigar a los organismos al nivel del ADN (Glaubitz y Moran, 2000). Dentro de los marcadores moleculares o basados en ADN los más conocidos son los RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), los microsatélites o SSR (Simple Sequence Repeat) y los RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Caetano-Anollés y Gresshoff, 1997).

De forma general los marcadores de ADN son indicadores de diversidad y permiten el mapeo de rasgos de interés (Caetano-Anollés y Gresshoff, 1997). Concretamente en los programas de mejoramiento de especies forestales han sido utilizados en la verificación de la pureza de los jardines clonales y ensayos genéticos, determinación de la huella genética para cada clon, posibilidades de selección temprana y determinación de la similitud

genética y análisis de parentesco dentro de la población de mejoramiento (Araya *et al.*, 2005b).

Sin embargo el establecimiento y manejo de esas plantaciones forestales, no ha sido fácil puesto que han sido muchos los años de investigación y ensayos para identificar especies arbóreas nativas y exóticas, prometedoras para reforestación. Dentro de las instituciones que han estado involucradas destacan el CATIE con proyectos como Madeleña a nivel centroamericano, igualmente la OET, FUNDECOR, FONAFIFO del MINAE y el proyecto REDES del ITCR. Esos proyectos han generado información valiosa sobre crecimiento, productividad, acumulación de biomasa y aspectos financieros de las especies (Montagnini, 2004). No obstante según Murillo *et al.* (2001), dentro del concepto de plantaciones forestales la silvicultura clonal, debe imponer un enorme cambio en el modelo de plantación. Badilla *et al.* (2000), manifiesta que la gran cantidad de contribuciones en técnicas de propagación vegetativa aportadas por las universidades costarricenses y especialmente por el CATIE, han influido en la concepción de una nueva silvicultura comercial. Tal es el caso de los esfuerzos realizados por Mesén y Trejos (1997) en la propagación vegetativa de *V. guatemalensis* mediante enraizamiento de estacas juveniles. Es así como para el desarrollo de un programa de mejoramiento genético y silvicultural, la reforestación clonal debe ser parte de éste para alcanzar el éxito (Murillo *et al.*, 2001).

Cabe mencionar que la evaluación de la variación genética a nivel de procedencias y de los clones seleccionados de árboles madre superiores tradicionalmente conlleva periodos muy largos para verificar la calidad del material seleccionado, esto debido a los largos ciclos que poseen las especies forestales, es por ello que las combinaciones de selección asistida por marcadores moleculares y ensayos de progenies podrían permitir resultados más rápidos y exactos en la selección de caracteres complejos como la tasa de crecimiento y calidad de la madera (Araya *et al.*, 2005b),

asegurando de esa manera que el fenotipo seleccionado realmente corresponda al genotipo deseado.

Dada la importancia de seleccionar adecuadamente los clones para programas de reforestación, en la presente investigación se utilizarán imprimadores que reconocen secuencias simples repetidas (SSR) de *V. ferruginea* (Lowe *et al.*, 2002). Estos imprimadores serán evaluados en la especie *V. guatemalensis*, para su utilización en el manejo y control de calidad de los jardines clonales, así como determinar la huella genética de los clones y conocer la diversidad genética, distancia genética y grado de parentesco entre ellos. La aplicación de los microsatélites viene a ofrecer una nueva herramienta de apoyo al programa de mejoramiento y conservación genética de *V. guatemalensis* desarrollado en la zona norte del país.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar los marcadores genéticos microsatélites o Secuencias Simples Repetidas (SSR) para el apoyo al programa de conservación y mejoramiento genético de *V. guatemalensis*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Obtener ADN de alta calidad a partir de las muestras de tejido vegetal (hojas) de clones de *V. guatemalensis*.
- Optimizar el protocolo para la amplificación de las secuencias simples repetidas en *V. guatemalensis*.
- Validar la técnica de microsatélites en *V. guatemalensis* para la identificación de clones.
- Determinar la huella genética de los clones de *V. guatemalensis*.
- Determinar parámetros genéticos para el estudio de las relaciones entre los clones de *V. guatemalensis*.

REVISION DE LITERATURA

Vochysia guatemalensis J.D. Smith pertenece a la familia Vochysiaceae y tiene como sinónimo *Vochysia hondurensis* Sprague, lo cual significa que se considera una sola especie dada la similitud que presentan en cuanto a las características vegetativas, florales y la anatomía de la madera (Flores, 1993).

Descripción general de la especie

Nombres comunes

Los nombres vernáculos que recibe esta especie son tan variados como su distribución. Así por ejemplo, en Costa Rica es conocida como Barba chele (nombre que también recibe en Nicaragua), Chanco, San Juanillo, Chanco blanco, Mayo, Mayo blanco, Palo de chanco y Cebo (los dos últimos usados más comúnmente en la Zona Norte), Sirbi y Tskirik (empleado por indígenas). Otros nombres que recibe esta especie según el país son: Yemeri en Nicaragua y Belice; Palo de agua en Nicaragua y México. En Panamá se le da los nombres de Corosillo, Mecri, Yameri y Yameri macho. México por su parte nombra esta especie como Corpus, Corpo, Maca blanca y Palo de tecolote. Palo Bayo, Robanchab, Ruanchap y Sayuc son los nombres que se le da en Guatemala. San Juan y San Juan Blanco son nombres comunes en países como Guatemala, Honduras y Belice. Sanpedrano por su lado es como se le conoce en Honduras y Guatemala. San Juan peludo y Flor de mayo son nombres específicos de Honduras. Finalmente en Belice se le nombra White mahogany, White Yemeri, Yemoke, Emeri o Emery (Flores, 1993; CATIE, 1997).

Algunas características de relevancia en esta especie señaladas por Flores (1993) incluyen la acumulación de aluminio en los tejidos foliares, tal

como lo indica Pérez *et al.* (1993) y el alto contenido de compuestos básicos y materia orgánica en los suelos donde crece *V. guatemalensis*, lo cual hace que esta especie sea una buena enriquecedora del suelo. En este sentido, Montagnini (2004), ha obtenido muy buenos resultados respecto a la fertilidad del suelo (contenido de nitrógeno y materia orgánica, mayor capacidad de intercambio catiónico y mejores propiedades físicas) en plantaciones con esta especie.

Distribución y Hábitat

V. guatemalensis es una especie mesoamericana. Su ámbito de distribución natural es desde el sur de México (Golfo de México) hasta Panamá (Flores, 1993). Constituye uno de los árboles más llamativos del bosque húmedo tropical y muy húmedo de las planicies costeras (Flores, 1993).

El rango de temperatura, el nivel de precipitación anual y el ámbito altitudinal reportados por Flores (1993), incluye parámetros de temperatura entre 24-30 °C, de 3000-5500 mm de lluvia anual y altitudes desde 0 a 1200 m.s.n.m.

Comúnmente se le encuentra en bosques secundarios en diferentes estados de desarrollo y en repastos (Butterfield y González, 1996). Aunque en Costa Rica se ha encontrado también en bosques primarios o vírgenes (Flores, 1993). En nuestro país se distribuye además en la Zona Atlántica (Butterfield y González, 1996).

Descripción Botánica

Forma del árbol: Es un árbol muy alto. El fuste es recto, liso, cilíndrico y sin gambas; de copa densa redondeada. En época seca caen las hojas, produciéndose abscisiones en las ramas menores (Flores, 1993). El tronco

no posee ramas y la base de éste es cónica o alargada; la copa es estratificada cuyas ramas angulares poseen follaje verde y brillante. (CATIE, 1997).

Flores (1993), reporta que la altura de los árboles varía de 30-55 m y el DAP de 0, 5-1,5 m, mientras que en CATIE (1997), se indica que la altura del árbol puede llegar hasta los 40 m y el diámetro a 1, 8 m.

Otros autores como COSEFORMA (2001), apunta que las alturas que pueden alcanzar dichos árboles son de 45 m, con un DAP de hasta 1 m y concuerdan además con las características antes señaladas para el fuste.

Por otra parte, en el estudio realizado por Delgado *et al.* (2003), en el que evaluaron el comportamiento de cinco especies utilizadas en reforestación en parcelas ubicadas en las cuatro zonas edafoclimáticas en las que se ha estratificado la zona norte de Costa Rica, se obtuvieron las mayores alturas en dos de esas zonas y *V. guatemalensis* fue la que registró los promedios de altura mayor entre las edades de 8-11 años, sin embargo dichos autores proponen la necesidad de realizar una fuerte intervención una vez que ésta especie supera los 3 años de edad, dado que los incrementos en altura total alcanzan el valor máximo entre los 3 y 5 años, de esa manera se asegura concentrar el crecimiento en un menor número de individuos pero con mayor calidad. Dicho estudio revela además que *V. guatemalensis* superó en todos los sitios evaluados a todas las especies consideradas, en lo que respecta al área basal y diámetro.

Flores: Se agrupan en panículas axilares o terminales de 10-30 cm de longitud, las cuales poseen ramificaciones compuestas en el extremo proximal y ramificaciones simples en el extremo distal (Flores, 1993). Dichas inflorescencias poseen una gran cantidad de flores amarillentas, de las cuales surgen las cápsulas con tres lóculos (COSEFORMA, 2001).

Las flores se caracterizan por ser perfectas, erectas en la copa y cuyo color las hace vistosas, se especifica además que la floración de los árboles empieza entre los 5 y 6 años. (CATIE, 1997).

Son flores hermafroditas, zigomorfas, con simetría anteroposterior y perígena, con pedicelos ligeramente pubescentes (Flores, 1993).

Frutos: Son cápsulas que pueden alcanzar hasta 7 cm de largo y 2,5 cm de ancho (CATIE, 1997). Son de color pardo amarillento y contienen dos semillas por lóculo y la longitud del fruto varía de 4,8 - 5,8 cm (Flores, 1993). Los tres lóculos que poseen forman tres ángulos y cada uno de éstos contiene una semilla alada. La maduración se da entre agosto y octubre, al abrirse las cápsulas en su extremo distal cuando la semilla alcanza su madurez (CATIE, 1997).

Hojas: Las hojas de ésta especie son simples, totalmente marginadas, ovaladas, cuyo haz es liso y brillante, con una longitud y ancho aproximado de 15-20 cm y 5-7 cm respectivamente (COSEFORMA, 2001). Otras características más detalladas incluyen la agrupación de las hojas en verticilos, generalmente con 4 hojas, aunque pueden encontrarse tres. Además en las ramas donde se forman las inflorescencias las hojas pueden ser opuestas o decusadas, de borde entero, con estomas tipo anomocítico, la cara adaxial color verde claro brillante y la cara abaxial verde grisácea opaca (Flores, 1993).

Semillas: La producción y tamaño de las semillas puede variar entre árboles, poblaciones e incluso de un año a otro, además en que son semillas alargadas y planas (CATIE, 1997; COSEFORMA, 2001). No obstante, difieren en la longitud que éstas pueden alcanzar, se reporta incluso un largo de hasta 5 cm (COSEFORMA, 2001). La longitud puede ser de hasta 7 cm, con un promedio de 4,5 cm (CATIE, 1997).

Las alas son unilaterales, de forma lisa y rígida. Rodeadas por una testa membranosa, sin endospermo (COSEFORMA, 2001; CATIE, 1997).

Es de color pardo claro, la epidermis contiene tricomas que cubren las semillas, constituyendo éstos la mayor parte del ala. El embrión de color blanco es quien almacena los materiales de reserva y éste junto con los cotiledones ocupa todo el espacio (COSEFORMA, 2001; Flores, 1993).

La semilla de esta especie se considera como tipo ortodoxa y si se almacenan adecuadamente su viabilidad puede permanecer por un periodo de hasta 2-3 meses (Flores, 1993).

Dentro de los patógenos que atacan las semillas están *Colleotrichium sp.*, *Fusarium sp.* y *Phoma sp.* (COSEFORMA, 2001; CATIE, 1997).

Corteza: La corteza es lisa, de color gris claro a blanco (CATIE, 1997; COSEFORMA, 2001), gruesa, con fisuras verticales y sabor amargo (Flores, 1993).

Condiciones de crecimiento

La amplia variedad de suelos en que crece esta especie va desde suelos inundados hasta suelos franco arenosos, franco arcillosos y compactados. Se adapta además a suelos ácidos y estériles; no obstante, las mejores características del suelo para su crecimiento es que éstos deben ser profundos y naturalmente fértiles (CATIE, 1997).

Características de la madera

La madera del cebo tiene dentro de sus peculiaridades un color blanco amarillento. No se diferencia la albura del duramen. Es una madera liviana, pero fuerte, con una velocidad de secado moderada. Es muy sensible al ataque de hongos e insectos como perforadores y termitas. Además se

podre fácilmente si se deja a la intemperie (Flores, 1993; COSEFORMA, 2001).

Los daños generados en el tronco por hongos del género *Verticillium*, así como por posibles parasitoides han sido reportados por Di Stéfano y Fournier (1998).

Tiene textura media y un brillo de regular a intenso, con reflejos dorados (CATIE, 1997). Posee poros visibles a simple vista y en condición seca es excelente para trabajar el cortado, cepillado y lijado (COSEFORMA, 2001).

Se señalan otros usos como: carpintería, construcciones rurales, postes, cajas, contraenchapados, formaletas y ebanistería (CATIE, 1997; Flores, 1993). No obstante, se indica que la producción de pulpa para papel es el principal potencial de la madera de *V. guatemalensis* (Flores, 1993; COSEFORMA, 2001). Los usos se determinan de acuerdo al tipo y calidad de la madera, un ejemplo de ello lo constituye el caso específico de Izabal, Guatemala, donde es utilizada en la construcción de canoas (Flores, 1993).

Marcadores Genéticos

Definición

Por lo general la definición de marcador genético incluye aquellos genes que pueden ser detectados debido a un efecto fenotípico (Caetano-Anollés y Gresshoff, 1997). Valadez y Kahl (2000) por otra parte, lo definen como cualquier gen cuya expresión permite un efecto fenotípico, que puede detectarse fácilmente. Un ejemplo otorgado por estos autores, constituye los genes que dan resistencia a diversos antibióticos.

Clasificación

Los marcadores genéticos se clasifican en tres grupos: marcadores morfológicos, marcadores bioquímicos y marcadores basados en ADN, estos últimos conocidos como marcadores moleculares. Los marcadores bioquímicos incluyen diferentes niveles de proteínas como isoenzimas y compuestos orgánicos como terpenos y aceites esenciales. El uso de marcadores bioquímicos al examinar el producto de los genes hace que su análisis sea complicado, debido a efectos como: la expresión de genes, epítasis o la redundancia en el código genético. Finalmente existe una gran variedad de marcadores basados en ADN o moleculares, los cuales han sido utilizados con mayor éxito en especies forestales. (Glaubitz y Moran, 2000).

Marcadores moleculares

Para comprender que es un marcador molecular o basado en ADN, se debe definir la palabra locus en términos de genética molecular, ya que su significado clásico se refiere a un gen en particular, ubicado en el genoma nuclear. Con el uso de marcadores moleculares dicho término ha variado y el sitio del marcador o locus, se refiere simplemente a la posición única de un segmento de ADN detectable dentro del genoma (nuclear, cloroplasto o mitocondria) y no necesariamente ese segmento de ADN detectable se encuentra formando parte de un gen. En árboles gran parte del ADN en el genoma nuclear no codifica genes y por tanto los marcadores de ADN se localizan en regiones intergénicas (Glaubitz y Moran, 2000).

Éstos marcadores, permiten observar diferencias reales entre secuencias homólogas del ADN de los organismos. Tales diferencias surgen por cambios o rearrreglos (translocaciones, inversiones, inserciones y deleciones) entre las pares de bases que constituyen moléculas como el ADN (Valadez y Kahl, 2000).

La importancia de estos marcadores por tanto, radica en la detección directa que se puede realizar de variaciones que experimenta un determinado organismo a nivel de ADN. En forma general este tipo de marcadores tienen las siguientes ventajas: se desarrollan de manera estable, carecen de efectos pleiotrópicos y no están sometidos al ambiente en que se desarrolla el organismo (Valadez y Kahl, 2000). Respecto a la última ventaja mencionada, tanto Valadez y Kahl (2000) como Demey *et al.* (2003), coinciden en que ésta los hace ampliamente útiles en comparación con otros marcadores genéticos como los proteicos y morfológicos.

Demey *et al.* (2003) con base en los resultados obtenidos de la relación entre caracterizaciones morfológicas y moleculares en *Manihot esculenta* (yuca), establece que los marcadores morfológicos en su mayoría sólo es posible evaluarlos a nivel de toda la planta. Además cuando ésta llega a su estado fisiológico adulto actúa de manera epistática, limitando el número de marcadores que pueden ser evaluados, sin equivocación en la población segregante. Por el contrario, estas limitaciones de medición son superadas cuando se utilizan marcadores moleculares donde las diferencias detectadas son producto de pequeñas alteraciones en el ADN, lo cual permite utilizar esta caracterización de forma previa. A pesar de ello, éste autor señala la relevancia de realizar estudios tanto con descriptores morfológicos como con marcadores moleculares para obtener una mejor descripción e interpretación de la diversidad genética de los individuos.

Debido a que el propósito de este estudio es el análisis de marcadores moleculares microsatélites, se aunara específicamente en éstos.

Microsatélites

Los microsatélites forman parte de un grupo mayor de marcadores moleculares llamados VNTRs (Repeticiones en Tandem de Número Variable), son conocidos como secuencias simples cortas, cuyo motivo

(secuencia aleatoria de bases nitrogenadas en el ADN) se encuentra repetido en serie a lo largo de genomas de hongos, plantas, animales y humanos. La unidad básica se conforma aproximadamente de 2-10 pares de bases. Estas secuencias son altamente variables en el número de unidades que las integran, por lo que su análisis para la búsqueda de polimorfismos es muy valioso (Valadez y Kahl, 2000).

Por otro lado, Goldstein y Schlotterer (1999), señalan que estas secuencias no sobrepasan seis pares de bases de largo y que son repeticiones en tandem, además que mucha de la literatura disponible genera confusiones, ya que, hay autores que han utilizado el término microsatélite para designar solamente secuencias motivos repetidas de dinucleótidos. Se han usado además una gran variedad de nombres para describir esas secuencias repetidas en tandem, esos nombres incluyen: secuencias simples repetidas (SSR), Polimorfismos Largos de Secuencias Simples (SSLP) y STRs (Repeticiones Cortas en Tandem) (Goldstein y Schlotterer, 1999; Lefort *et al.*, 1999); por lo que estos autores señalan que lo más apropiado es utilizar el término de secuencia simple para describir todas las secuencias motivos cortas repetidas, incluyendo los minisatélites. Otros autores como Caetano-Anollés y Gresshoff (1997), mencionan que estas secuencias consisten en unidades centrales de 2-5 nucleótidos repetidos en tandem. Glaubitz y Moran (2000), definen estos marcadores como Secuencias Simples Repetidas (SSR), haciendo la salvedad, de que eso implica que son segmentos de ADN que contienen secuencias motivo simples repetidas en tandem.

Características

Las secuencias simples repetidas se caracterizan por ser marcadores altamente polimórficos, considerablemente informativos dado el alto nivel de polimorfismo y codominancia. Tienen además alto poder de discriminación,

el número de fragmentos o loci obtenidos es alto con respecto a otros marcadores, la transferencia de fragmentos se da incluso dentro de subgéneros, la reproducibilidad es muy alta y trabajar con ellos es de fácil a moderado (Glaubitz y Moran, 2000).

Ventajas del uso de microsatélites

- La secuencia simple repetida del ADN se encuentra dispersa en todo el genoma cuando se trabaja con células eucariotas (Valadez y Kahl, 2000).
- Todas las especies en que las secuencias simples repetidas con oligonucleótidos han sido probadas, han mostrado información genética polimórfica (Valadez y Kahl, 2000).
- Para realizar análisis de huellas genómicas, existen oligonucleótidos marcados radiactivamente y métodos alternativos usando digoxigenina y biotina (Valadez y Kahl, 2000).
- No cambian por efecto del medio ambiente, ni por la fase de desarrollo de la planta, esta ventaja se aplica en general a todos los marcadores moleculares (Haines, 1994).

Aplicaciones de los marcadores moleculares en especies forestales

En términos generales los marcadores moleculares tienen una serie de aplicaciones, con las que muchos autores coinciden. Algunas de ellas incluyen la medida de la diversidad genética, la estimación de la tasa de flujo o migración de genes, la caracterización y análisis de sistemas de apareamiento, análisis de paternidad o parentesco, determinación de la eficiencia en huertos semilleros, análisis cuantitativos de loci y estudios filogenéticos o taxonómicos (Glaubitz y Moran, 2000; Valadez y Kahl, 2000).

Además el establecimiento de huellas genéticas y su verificación (Glaubitz y Moran, 2000; Valadez y Kahl, 2000; Haines, 1994). Respecto a

este uso, Valadez y Kahl (2000), hacen referencia al establecimiento de huellas genómicas en variedades cultivadas y también en patógenos, con el fin de lograr el mejoramiento en cualquier tipo de planta, no solo en especies arbóreas. Por otro lado, Haines (1994), menciona que algunas utilidades de realizar la huella genética en especies arbóreas es para lograr la identificación de clones, la determinación de contaminación en los huertos por individuos no deseables y las distintas modalidades de entrecruzamiento.

El control de calidad en programas de producción de árboles es otra de las aplicaciones de este tipo de marcadores (Glaubitz y Moran, 2000; Haines, 1994); sin dejar de lado la relevancia de realizar mapas de ligamiento genético (Caetano-Anollés y Gresshoff, 1997; Glaubitz y Moran, 2000; Valadez y Kahl, 2000), mapeo comparado para determinar homologías del genoma entre especies (Valadez y Kahl, 2000), identificación de genotipos, determinación del tamaño exacto de los alelos (Caetano-Anollés y Gresshoff, 1997) y cuantificación de la variación genética (Haines, 1994).

Una de las aplicaciones que muchos autores indican, pero en la que aún no se ha logrado nada en concreto es la selección temprana asistida por marcadores (Caetano-Anollés y Gresshoff, 1997; Glaubitz y Moran, 2000; Haines, 1994; Araya *et al.*, 2004).

Específicamente con microsatélites en el campo de conservación y mejoramiento de especies forestales algunos autores mencionan aplicaciones tales como: certificación de semillas genéticamente mejoradas, conservación de poblaciones espacialmente fragmentadas con árboles esparcidos, los cuales pueden ser genéticamente viables (Glaubitz y Moran, 2000) y la medición de las consecuencias de autogamia y exogamia (Goldstein y Schlotterer, 1999).

MATERIALES Y METODOS

El estudio se realizó en el Laboratorio de Ecología-Genética de la Escuela de Biología, en la Universidad de Costa Rica, ubicada en Montes de Oca, San José, Costa Rica.

Obtención del material vegetal

Se colectaron hojas jóvenes de 62 clones de *Vochysia guatemalensis*, los cuales se encuentran establecidos en un jardín clonal en el Instituto Tecnológico de Costa Rica, San Carlos, Alajuela. Fueron empacados y rotulados con su respectivo número de clon y transportados en bolsas plásticas selladas.

Extracción de ADN de tejido vegetal (hojas) de clones de *Vochysia guatemalensis*.

Antes de la extracción del ADN se asignó un número de muestra para cada clon con el fin de facilitar el manejo del material vegetal (Apéndice 1).

El ADN fue extraído utilizando una metodología basada en CTAB (Lodhi *et al.*, 1994), con algunas modificaciones realizadas por Araya *et al.* (2005a).

En un tubo de 1,5 mL se colocan aproximadamente de 50-100 mg de tejido vegetal de cada muestra. Se adicionan 250 µL de amortiguador de extracción (Tris-HCl 100 mM a pH 8.0, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, CTAB 2%, PVP 2% y Mercaptoetanol 0,2%), e inmediatamente se macera el tejido.

Posteriormente se agrega 500 µL del mismo amortiguador de extracción, se incuban los tubos a 65 °C por 45 minutos. Una vez finalizada la incubación, se dejan enfriar los tubos a temperatura ambiente y se adicionan 750 µL de cloroformo-octanol (24:1) mezclando 20 veces por inversión. Luego en la centrífuga Chermle Z252 MK (Top Laboriechnik

GmbH) se realizó una centrifugación a 6000 rpm por 15 minutos y se extrajo aproximadamente 400 µL del sobrenadante, el cual se agregó en otro tubo de 1,5 mL.

Al sobrenadante se le añade 0,5 volúmenes de NaCl 5M (200 µL) y 2 volúmenes de etanol absoluto frío (800 µL). Seguidamente se agita el tubo y se incuba a -15 °C por una hora.

Luego se efectúa una centrifugación a 10 000 rpm por 10 minutos y se descarta el sobrenadante, tratando de evitar el desprendimiento del botón. Se agregan 750 µL de etanol al 70% y se descarta el etanol para secar el botón a 37°C por 30-60 minutos aproximadamente. Finalmente se resuspende el botón en 100 µL Amortiguador TE (10 mM Tris HCL pH 8.0, 1 mM EDTA) y se almacena el ADN, preferiblemente a -15 °C.

Para visualizar el ADN se realizó una electroforesis utilizando un gel de agarosa al 1% para el cual se empleo la cámara modelo 170-4401 de BIO-RAD. Se efectuó durante 45 minutos, usando amortiguador TAE 1X a 75 V con la fuente de poder EC452 (E-C Apparatus Corporation).

El gel fue teñido con una solución de bromuro de etidio en una concentración de 0,5 uL/10mL.

Una vez finalizada la electroforesis y la tinción del gel, la visualización y análisis del ADN total se realizó con una lámpara de luz ultravioleta.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para los marcadores moleculares SSR

Evaluación Inicial

La evaluación inicial de la amplificación de los cinco imprimadores se llevo a cabo utilizando una muestra de ADN distinta para cada imprimador. Se probaron dos mezclas de PCR diferentes con concentraciones de 1,5 y 2 mM de MgCl₂. Se procedió con base en el perfil térmico y la mezcla de PCR

establecida por Lowe *et al.* (2002), con algunas modificaciones. Los cinco pares de imprimadores evaluados (Cuadro 1) se tomaron de la metodología descrita por Lowe *et al.* (2002).

Durante la electroforesis el marcador de peso molecular empleado fue el SM0613 de 50-1000 pb (Fermentas TM).

Debido a que en ésta evaluación inicial no se obtuvieron los resultados esperados (Figura 2), se realizaron algunas modificaciones a la metodología especificada por Lowe *et al.* (2002).

Optimización del protocolo de amplificación

La metodología valorada inicialmente señala el uso de una sola temperatura de apareamiento para todos los imprimadores, por tanto se evaluó un gradiente de temperaturas de apareamiento para cada uno de los imprimadores (adelantamiento y reverso). Dichas temperaturas de apareamiento se calcularon teniendo como referencia la temperatura de fusión (T_m por sus siglas en inglés) de cada imprimador, la cual se obtuvo de las secuencias reportadas por la casa comercial Operon Biotechnologies, Inc.

Se evaluaron siete temperaturas distintas para cada imprimador con la muestra de ADN de un solo clon (Figura 3), siguiendo las condiciones de PCR descritas por Schuelke (2000) y la mezcla de PCR sugerida por Lowe *et al.* (2002). En ambas metodologías se realizaron algunas modificaciones.

Las temperaturas evaluadas en el imprimador A1-5 fueron de 50 - 50,2 - 50,8 - 51,5 - 52,6 - 53,9 y 55,4 °C. Para el imprimador A1-26 las temperaturas evaluadas fueron de 53,9 - 55,4 - 56,7 - 57,7 - 58,3 - 58,8 y 59 °C. En el imprimador A1-35 se evaluaron las temperaturas de 56,3 - 57,3 - 58,5 - 59,8 - 61 - 61,8 y 62,4 °C. Para los imprimadores A1-15 y A1-20 se evaluaron las temperaturas de 58,5 - 59,8 - 61 - 61,8 - 62,4 - 62,9 y 63 °C.

Una vez establecidas las condiciones para la extracción del ADN y para la Reacción en Cadena de la Polimerasa, se procesaron las muestras con el

fin de realizar las pruebas de validación y los análisis de las relaciones genéticas de todos los clones estudiados. Se siguieron las condiciones de PCR especificadas en el cuadro 2 y la reacción de PCR se realizó en un volumen final de 15 uL. Las concentraciones finales fueron: 1X amortiguador para PCR, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 2 pmol del imprimador de adelantamiento (Forward Primer), 8 pmol del imprimador reverso (Reverse Primer), 8 pmol del imprimador M13(-21) marcado con fluorocromo, de 50-100 ng de ADN y 1 U de Taq polimerasa.

La amplificación se efectuó usando el termociclador modelo PTC-200 (Peltier Thermal Cycler) de MJ Research, Inc.

Cuadro 1. Imprimadores utilizados en el PCR para amplificar las secuencias simples repetidas (SSR).

Locus	SSR	Referencia en el banco de genes	Imprimador que copia hacia delante	Imprimador que copia en reversa	Temperatura de apareamiento (°C) *	Tamaño del Producto (pb)
A1-5	(GA) ₁₆	AF436086	TCCCCCACTCC TCTTCATATAGT	GAAAATGGAAGC AAATGGAAAAT	52,5	137
AI-26	(GA) ₁₀ AA (GA) ₉	AF436085	TATGCTGAACTT TACCCAGAAA	TGGACACTAATC AAGCATTATGG	57,7	192
AI-20	(GT) ₈ GAGT (GA) ₁₂	AF436079	TAGTCCCTAGTC CCTAATCCCC	TCTTCAGATACA TTCCCTCTCCTC	61,8	109
AI-15	(GA) ₁₂	AF436083	ACAGGAGTAGTC ACCTTCATCCA	GGACATGCAATA CAATCGACACG	61,8	92
AI-35	(GA) ₁₇	AF436087	GGTCTACTCATA TCATGCCGAAC	ATGAATGGATTT ACCGTCTACCC	59,8	170

Fuente: Tomado y modificado de Lowe *et al.* (2002).

*Corresponde a un valor intermedio de las siete temperaturas evaluadas.

Cuadro 2. Perfil térmico o condiciones de PCR para la amplificación de las SSR de los clones de *V. guatemalensis*.

Programa	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
1	Desnaturalización inicial	94°C	5'	1
2	Desnaturalización	94°C	30"	30
	Apareamiento	*	45"	
	Rampa	1 °C/s	-	
	Extensión	72°C	45"	
3	Desnaturalización	94°C	30"	8
	Apareamiento del M13	53°C	45"	
	Extensión	72°C	45"	
4	Extensión final	72°C	10'	1
5	Almacenamiento	4 °C	∞	-

Fuente: Tomado y Modificado de Schuelke (2000).

*En el cuadro 1 se indica la temperatura de apareamiento para cada imprimador.

Visualización de los productos de PCR

Los productos de PCR resultantes de la evaluación inicial de la amplificación (Figura 2) fueron visualizados en un gel de agarosa de la misma forma en que se visualizó el ADN total.

Los productos de PCR resultantes de la evaluación de las distintas temperaturas de apareamiento (Figura 3), fueron visualizados en geles de poliacrilamida (solución de acrilamida al 7% con 70 ul de TEMED y 35 ul de persulfato de amonio al 25%) y revelados con tinción de plata, utilizando cámaras de electroforesis de BIO-RAD con capacidad para 24 muestras. Se tomaron 5 uL del producto amplificado con 3 uL de amortiguador de carga 6X. La desnaturalización tanto del marcador SM0371 de 50-1000 pb (Fermentas™) como de las muestras, se llevo a cabo en el termociclador Gene Cycler, serie 10154, de BIO-RAD, a 95 °C por 5 minutos e inmediatamente se colocaron en hielo. La electroforesis se realizó durante 1

hora, utilizando amortiguador TBE 1X a 55 V, con la fuente de poder Power PAC 3000, modelo 165-5056, de BIO-RAD.

Validación de la metodología de las SSR para la verificación de Clones

Una vez definida la temperatura de apareamiento de cada imprimador, la validación de la metodología de las Secuencias Simples Repetidas para la verificación de los clones de *V. guatemalensis* se realizó empleando dos brotes de cada uno de los siguientes 10 clones: 102-3, 33-1, 41-3, 101-3, 200-4, 104-4, 120-6, 39-3, 19-8, 103-7 (Apéndice 1).

La amplificación se realizó mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con la mezcla de PCR antes mencionada y siguiendo el perfil térmico del cuadro 2. En total se utilizaron 20 muestras correspondientes a las parejas de brotes de cada clon. El control usado consistió en la mezcla de PCR sin ADN y en lugar de éste se agregó agua destilada.

Los productos obtenidos fueron inicialmente revelados por el analizador genético ABI 310 (Applied Biosystems), utilizando la mezcla del cuadro 3.

Sin embargo se determinó finalmente correr los productos en geles de poliacrilamida tal y como se describió anteriormente; con la excepción de que la electroforesis se corrió durante 1 hora y 10 minutos, hasta que el amortiguador de carga comenzara a salir.

A cada uno de los loci (cada imprimador) se le proporcionó una nomenclatura con el fin de darle nombre y numerar los alelos derivados en cada uno de ellos (Cuadro 4).

Cuadro 3. Mezcla de ABI 310 para Microsatélites de clones de *V. guatemalensis*.

Componente	Cantidad para 1 reacción (ul)
Formamida	12
Liz 500	0,5
Fam	1
Vic	1
Ned	1
Pet	1
Volumen Final	16,5

Fuente: Laboratorio de Ecología-Genética, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 2005.

Análisis de datos de los SSR

Análisis descriptivos

Tamaño de alelos

El peso molecular de los alelos se calculó por comparación con el marcador 50 pb DNA ladder SM0371 (FermentasTM). Se realizó un análisis de regresión entre el peso molecular de las diferentes bandas del marcador y la distancia de migración del mismo en la electroforesis. Este análisis generó una ecuación de regresión que fue utilizada para calcular el peso molecular de cada uno de los alelos identificados en los loci A1-20, A1-5, A1-15 y A1-35.

Se asignó un número a cada alelo (a menor tamaño en pb, menor número) con el propósito de establecer el genotipo para cada clon.

Luego de determinar el tamaño de los alelos se tomó la decisión de trabajar los distintos análisis para los loci A1-20 y A1-15, únicamente con los clones que amplificaron con esos dos loci (33 clones).

Además se calculó el Contenido de Información Polimórfica (PIC) con el fin de conocer que tan informativos son los locus A1-20 y A1-15. El cálculo se realizó de la siguiente manera:

$$\text{PIC} = 1 - \sum_i p_i^2, \text{ } p_i \text{ es la frecuencia de los alelos observados en el locus } i$$

Frecuencias alélicas

Gracias al carácter codominante de los microsatélites, es posible utilizar métodos tradicionales de genética de poblaciones para calcular frecuencias alélicas.

Una vez establecido el genotipo de cada clon mediante el número asignado a los diferentes alelos encontrados, se determinó la frecuencia de cada alelo, contando las veces en que cada número (cada alelo) se repetía en el locus y dividiendo entre el número total de alelos de los 33 clones.

Determinación de la huella genética

Una vez que se determinó la cantidad y tamaño de alelos en cada locus, se logró generar la huella genética para 33 clones con la utilización de dos microsatélites.

Diversidad y distancias genéticas

Estructura genética – diversidad

La estructura genética fue determinada con base en las frecuencias alélicas de cada uno de los loci. Los valores de diversidad genética se calcularon según Gregorius (1978) usando la siguiente fórmula:

$v = (\sum p_i^2)^{-1}$, donde p_i es la frecuencia de cada uno de los alelos en los loci analizados.

Distancia Genética

Una vez establecido el genotipo de los 33 clones para los dos loci elegidos se realizó una comparación de cada pareja de clones, determinando el número de alelos que compartían. Ese resultado se trasladó a un porcentaje definiendo la similitud entre cada una de las parejas de clones. Una vez determinada la similitud, la distancia fue calculada de la siguiente manera:

$$\text{Distancia Genética} = 1 - \text{valor similitud}$$

Distancia Genética Colectiva

Se determinó el grado de similitud de cada clon con respecto al resto del grupo utilizando la medida de distancia genética de Gregorius (1974).

Análisis estadísticos

Utilizando el programa Statistical Release 6 se generó el agrupamiento a través de un análisis de conglomerados o dendrograma UPGMA (Unweighted Pair-Group Average) basado en la matriz de distancia genética para los pares de clones. Además del dendrograma se realizó un análisis multivariado de ordenación denominado "multidimensional scaling" el cual permite explicar similitudes-disimilitudes (distancias) observadas entre los elementos investigados, agrupándolos de acuerdo a la proporción de la variación que estos explican en el modelo.

RESULTADOS

Extracción de ADN de tejido vegetal (hojas) de clones de *Vochysia guatemalensis*.

Para verificar la calidad del ADN obtenido luego del proceso de extracción y determinar la concentración de éste, se procedió a correr las muestras suspendidas en amortiguador TE con el fin de determinar la eficiencia del método de extracción usado.

La presencia de ADN fue clara para cada una de las muestras procesadas, puesto que se observan bandas de alto peso molecular al inicio del gel, aunque en algunos carriles se aprecian bandas más tenues. Los resultados obtenidos se disponen en la siguiente figura:

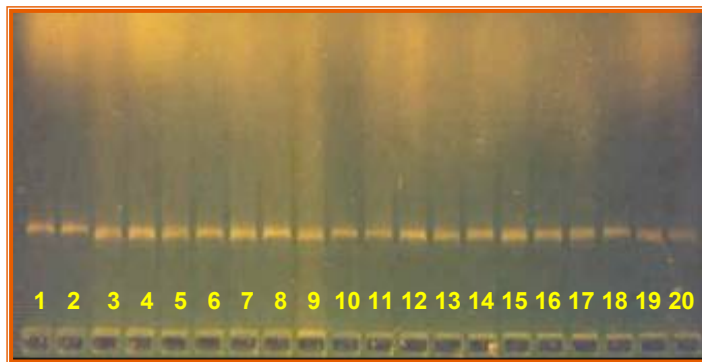


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ADN total de los clones 102-3, 33-1, 41-3, 101-3, 200-4, 104-4, 120-6, 39-3, 19-8, 103-7 de *V. guatemalensis*.

Fuente: Laboratorio de Ecología-Genética, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 2005.

Se puede notar que en ninguno de los carriles hay evidencia de barridos que indiquen la degradación del ADN. Por tanto la presencia de bandas definidas permite evaluar la efectividad del protocolo de extracción.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para los marcadores moleculares SSR

Evaluación inicial

La figura 2 muestra la evaluación inicial de la amplificación. Luego del marcador de peso molecular, las primeras cinco muestras corresponden a la mezcla de PCR con una concentración final de 1,5 mM de $MgCl_2$ y las siguientes cinco muestras a una concentración final de 2 mM de $MgCl_2$.

Lamentablemente el uso de un marcador de peso molecular no adecuado incapacita el hecho de poder determinar el tamaño aproximado de los fragmentos generados.

Por otro lado en el pozo número 12, en el cual se colocó el control no se observa amplificación.



Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1% con productos de PCR a dos concentraciones distintas de $MgCl_2$. 1= marcador. 2-6= mezcla de PCR con una concentración final de 1,5 mM de $MgCl_2$. 7-11= mezcla de PCR con una concentración final de 2 mM de $MgCl_2$. 12 =control. Pozos 2, 3, 7 y 8= clon #102-3. Pozos 4, 5, 9 y 10= clon #33-1. Pozos 6 y 11 = clon #41-3

Fuente: Laboratorio de Ecología-Genética, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 2005.

En general a partir del pozo 7 y específicamente en el pozo 9 de la figura anterior se denota que la mezcla de PCR con la concentración de 2mM de $MgCl_2$ generó bandas más definidas.

Optimización del protocolo de amplificación

Al correr los mismos productos de PCR de la figura 2 en gel de acrilamida no se observó amplificación, por ello se elaboró una combinación de las metodologías propuestas por Schuelke (2000) y Lowe *et al.* (2002), probando siete diferentes temperaturas de apareamiento para cada imprimador con la muestra de ADN de un solo clon. Después de la evaluación de las siete temperaturas de apareamiento se eligió una temperatura intermedia para cada imprimador (Cuadro1), dado que como lo indica la figura 3 en todas las temperaturas evaluadas hubo amplificación.

Así, la figura 3 A y B muestran las bandas observadas en geles de acrilamida de los productos de PCR obtenidos. En la figura 3A específicamente se evidencian las bandas producidas por los cinco controles, es decir, cada uno de los imprimadores con todos los componentes de la mezcla de PCR excepto el ADN y en lugar de éste se le agregó agua destilada.

Además la muestra con las distintas temperaturas de apareamiento que contenía el imprimador A1-15 y A1-5 se traslaparon.

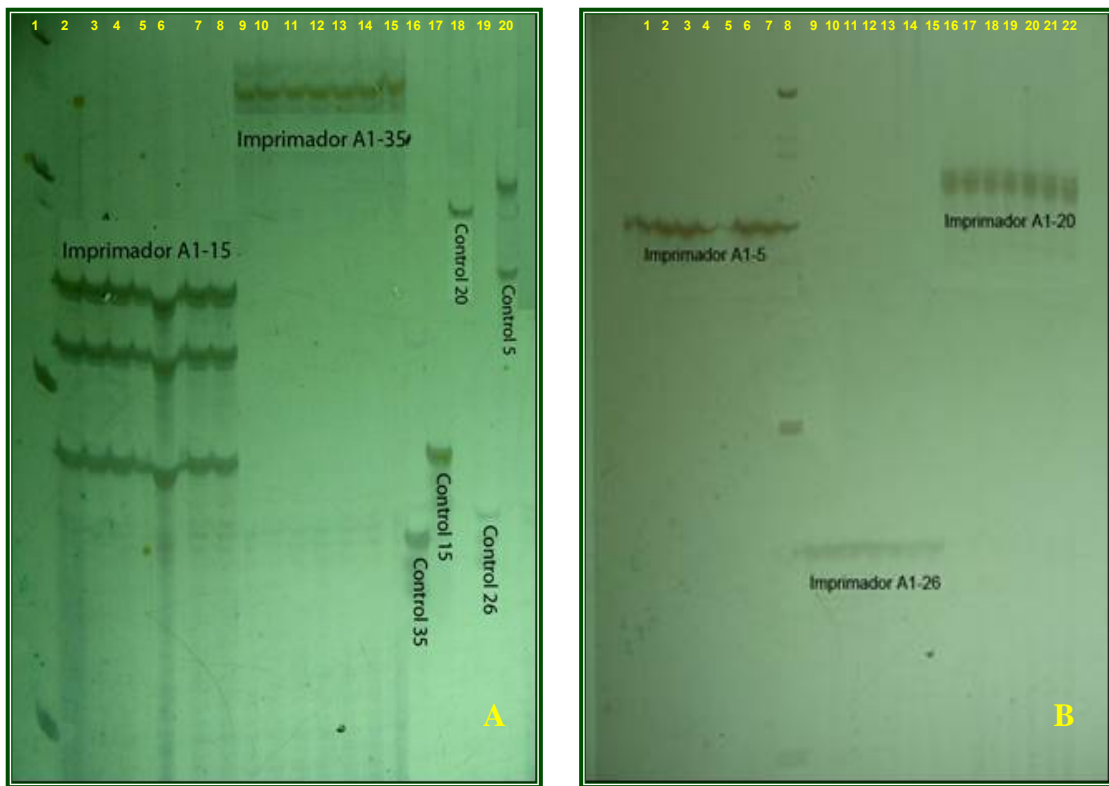


Figura 3. Electroforesis en geles de acrilamida con productos de PCR de los cinco imprimadores con el clon # 101-3 a distintas temperaturas de apareamiento.

A- 1= Marcador de peso molecular. 2-8= productos de PCR con el imprimador A1-15. 9-15= productos de PCR con el imprimador A1-35. 16-20= controles de cada imprimador.

B- 1-7= productos de PCR con el imprimador A1-5. 8= marcador de peso molecular. 9-15= productos de PCR con el imprimador A1-26. 16-22= productos de PCR con el imprimador A1-20.

Fuente: Laboratorio de Ecología-Genética, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 2005.

Validación de la metodología de las SSR para la verificación de Clones

El tamaño en pares de bases de los fragmentos amplificados fue determinado tanto para los alelos observados en el ABI 310 como en los geles de poliacrilamida. Los pares de bases de los posibles alelos encontrados en los dos tipos de electroforesis fue similar (Cuadro 4). Sin embargo, las salidas del analizador genético ABI 310 presentaron un alto número de picos con intensidades menores o similares a las de los verdaderos alelos (ruido), lo cual tiende a confundir la elección de los alelos

para análisis posteriores (resultados no mostrados). Por lo tanto, se decidió tomar los resultados obtenidos con los geles de poliacrilamida para la validación de los microsatélites en la verificación de clones, ya que en éstos se observó una resolución idónea para la interpretación de las electroforesis.

En la figura 4 se presentan las electroforesis de los pares de brotes de un mismo clon para cuatro microsatélites, ya que en el locus A1-26 no hubo amplificación. Se observa con algunas excepciones que cada pareja de clones tiene los mismos alelos.

Cuadro 4. Posibles alelos observados en cada imprimador y su respectivo tamaño en pb al analizar 10 clones para la validación de la técnica de microsatélites mediante dos electroforesis distintas.

Imprimador	Nomenclatura Asignada	Alelos observados		Tamaño (pb)	
		ABI 310	Acrilamida	ABI 310	Acrilamida
A1-20	Locus A	Todo	A1		143
		Igual	A2	-	148
			A3		154
		control	A4		167
A1-5	Locus B	B1	B1	145	147
		B2	B2	159	150
A1-15	Locus C	C1	C1	103	103
		C2	C2	112	112
		C3	C3	119	118
		C4	-	127	-
A1-35	Locus D	D1	D1	182	159
		D2	D2	185	174
		D3	D3	192	177
		-	D4	-	182
A1-26	-	No hubo amplificación			

Fuente: Laboratorio de Ecología-Genética, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 2005.

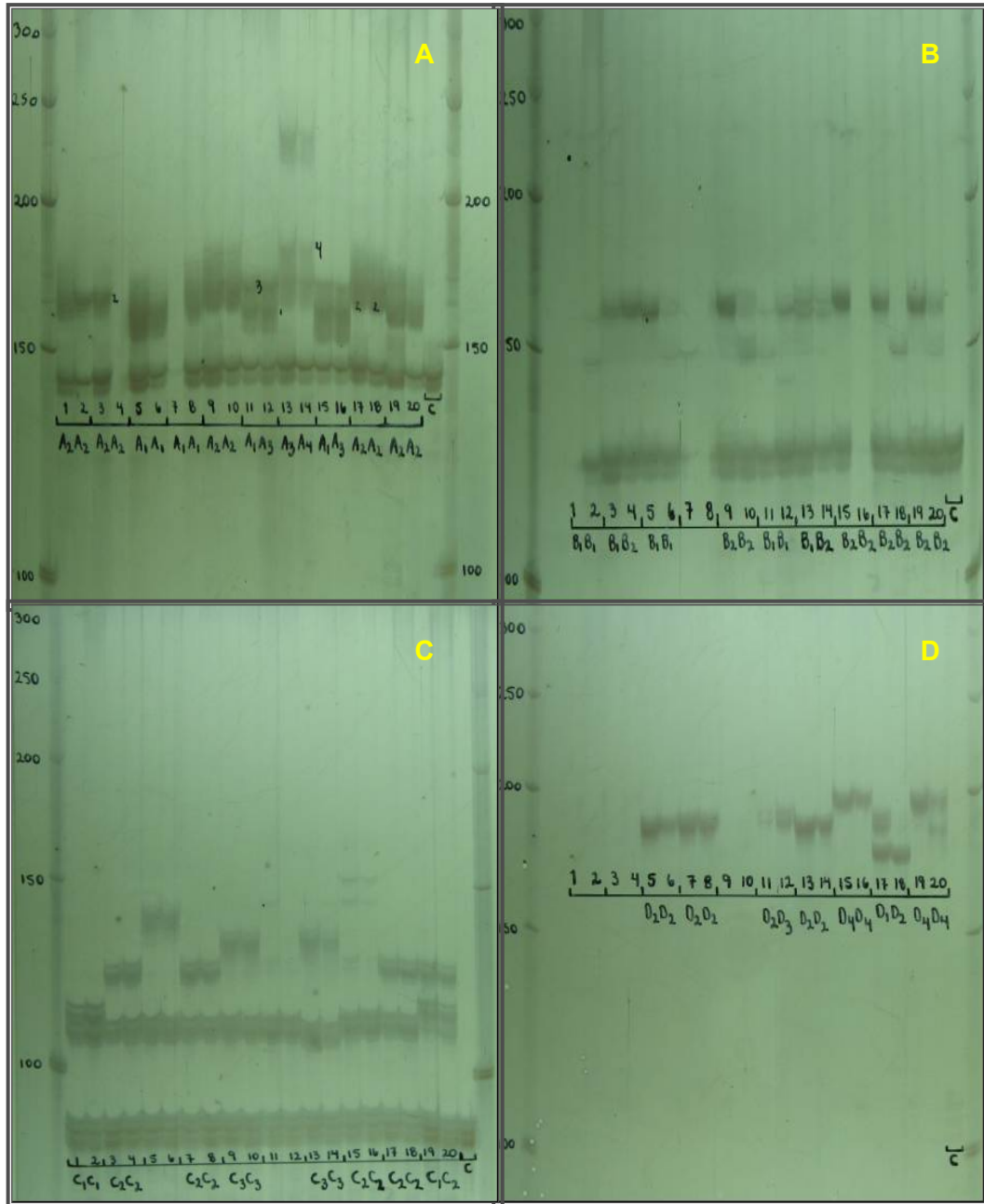


Figura 4. Electroforesis en gels de acrilamida de la validación de la técnica de microsatélites en *V. guatemalensis* con dos brotes de un mismo clon.

A- Alelos observados con el imprimador A1-20.

B- Alelos observados con el imprimador A1-5.

C- Alelos observados con el imprimador A1-15.

D- Alelos observados con el imprimador A1-35.

Fuente: Laboratorio de Ecología-Genética, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 2005.

Análisis de datos de los SSR

Análisis descriptivos

Tamaño de alelos

Al analizar la totalidad de muestras de clones de *V. guatemalensis* (62) se detectaron diferentes alelos en cada locus. De los cuatro loci analizados el mayor polimorfismo lo presentaron los loci A1-20 y A1- 15 con 7 alelos diferentes, mientras que el menor polimorfismo lo presentó el locus A1- 5 con 5 alelos distintos (Cuadro 5).

Cuadro 5. Tamaño o peso molecular de los alelos identificados en cada locus y su promedio, al analizar los 62 clones mediante geles de poliacrilamida.

Imprimador	Alelo	Peso Molecular (pb)
	1	140
	2	144
A1-20	3	149
Locus A	4	155
	5	160
	6	175
	7	178
Promedio tamaño alelos		157
	1	131
A1-5	2	135
Locus B	3	139
	4	147
	5	152
Promedio tamaño alelos		140
	1	97
	2	102
A1-15	3	110
Locus C	4	116
	5	119
	6	122
	7	124
Promedio tamaño alelos		112
	1	160
	2	169
A1-35	3	172
Locus D	4	175
	5	178
	6	184
Promedio tamaño alelos		173

Fuente: Laboratorio de Ecología-Genética, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 2005.

Por otra parte el Contenido de Información Polimórfica (PIC) fue de 0,83 para el locus A y de 0,72 para el locus C. Además se determinó el PIC promedio el cual fue de 0,77.

Frecuencias alélicas

A pesar de que los cuatro loci analizados fueron polimórficos (Cuadro 5), las frecuencias alélicas fueron calculadas con los loci señalados en el cuadro 6.

Cuadro 6. Frecuencias alélicas de los loci A1-20 y A1-15.

Frecuencia Alélica		
Alelo	Locus A (Imprimador A1-20)	Locus C (Imprimador A1-15)
1	0,05	0,45
2	0,18	0,03
3	0,23	0,20
4	0,17	0,12
5	0,06	0,14
6	0,18	0,03
7	0,14	0,03

Determinación de la huella genética

Como puede observarse en el Cuadro 7, la determinación de una huella genética para todos los clones de *V. guatemalensis* no fue posible. Se determinó solamente para 33 clones y fue obtenida con base en la utilización de 2 microsatélites.

Cuadro 7. Elaboración de la huella genética para 33 clones de *V. guatemalensis* a partir de dos microsatélites.

Imprimador		
Clon	A1-20 (Locus A)	A1-15 (Locus C)
2	A7A7	C1C3
3	A7A7	C1C1
4	A7A7	C1C5
6	A7A5	C1C3
7	A6A6	C1C5
8	A6A6	C1C1
9	A6A6	C1C5
10	A5A5	C1C1
11	A6A6	C1C3
14	A6A6	C2C3
17	A7A7	C1C6
18	A6A6	C1C6
29	A4A4	C4C4
33	A2A4	C4C7
34	A4A4	C4C5
37	A4A4	C4C5
39	A2A4	C4C4
42	A4A5	C1C5
43	A2A2	C1C5
44	A3A3	C1C3
45	A1A3	C3C3
46	A3A3	C1C5
47	A2A2	C3C4
48	A4A4	C1C3
49	A2A2	C1C7
50	A2A2	C1C3
51	A3A3	C1C3
52	A3A3	C1C3
53	A1A3	C1C2
54	A2A2	C1C1
55	A3A3	C1C3
56	A1A3	C1C5
58	A3A3	C1C1

Una vez obtenida la identidad de cada uno de los 33 clones, se pudo reconocer algunos individuos que podrían pertenecer al mismo clon, a pesar de estar etiquetados como clones distintos. Cada uno de los colores indica las muestras que corresponden a los clones que podrían ser los mismos y puede observarse que ninguna de las otras muestras tiene el mismo juego de alelos con ambos microsatélites.

Diversidad y distancias genéticas

Estructura genética – diversidad

El valor de diversidad genética obtenido para el locus A (imprimador A1-20) fue de 5,89 y para el locus C (imprimador A1-15) de 3,55. El valor de diversidad promedio fue de 4,72.

Distancia Genética

En el cuadro 8 se muestran los valores de distancia genética obtenidos luego de comparar los 33 clones que amplificaron con los loci A1-20 y A1-15.

Los valores resaltados corresponden a valores de distancia genética que indican las muestras que podrían ser un mismo clon.

Cuadro 8. Matriz de distancia genética entre los clones que amplificaron con los loci A1-20 y A1-15.

	2	3	4	6	7	8	9	10	11	14	17	18	29	33	34	37	39	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	58						
2	0																																						
3	0,25	0																																					
4	0,25	0,25	0																																				
6	0,25	0,5	0,5	0																																			
7	0,75	0,75	0,5	0,75	0																																		
8	0,75	0,5	0,75	0,75	0,25	0																																	
9	0,75	0,75	0,5	0,75	0	0,25	0																																
10	0,75	0,5	0,75	0,5	0,75	0,5	0,75	0																															
11	0,5	0,75	0,75	0,5	0,25	0,25	0,25	0,75	0																														
14	0,75	1	1	0,75	0,5	0,5	0,5	1	0,25	0																													
17	0,25	0,25	0,25	0,5	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	1	0																												
18	0,75	0,75	0,75	0,75	0,25	0,25	0,25	0,75	0,25	0,5	0,5	0																											
29	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0																										
33	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,5	0																									
34	1	1	0,75	1	0,75	1	0,75	1	1	1	1	1	0,25	0,5	0																								
37	1	1	0,75	1	0,75	1	0,75	1	1	1	1	1	0,25	0,5	0	0																							
39	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,25	0,25	0,5	0,5	0																						
42	0,75	0,75	0,5	0,5	0,5	0,75	0,5	0,5	0,75	1	0,75	0,75	0,75	1	0,5	0,5	1	0																					
43	0,75	0,75	0,5	0,75	0,5	0,75	0,5	0,75	0,75	1	0,75	0,75	1	0,75	0,75	0,75	0,75	0,5	0																				
44	0,5	0,75	0,75	0,5	0,75	0,75	0,75	0,75	0,5	0,75	0,75	0,75	1	1	1	1	1	0,75	0,75	0																			
45	0,75	1	1	0,75	1	1	1	1	0,75	0,75	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,5	0																		
46	0,75	0,75	0,5	0,75	0,5	0,75	0,5	0,75	0,75	1	0,75	0,75	1	1	0,75	0,75	1	0,5	0,5	0,25	0,75	0																	
47	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,75	0,75	1	1	0,5	1	0,5	1	0,75	1	0																
48	0,5	0,75	0,75	0,5	0,75	0,75	0,75	0,75	0,5	0,75	0,75	0,75	0,5	0,75	0,5	0,5	0,75	0,5	0,75	0,5	0,75	0,75	1	0															
49	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	1	0,75	0,75	1	0,5	1	1	0,75	0,75	0,25	0,75	1	0,75	0,5	0,75	0														
50	0,5	0,75	0,75	0,5	0,75	0,75	0,75	0,75	0,5	0,75	0,75	0,75	1	0,75	1	1	0,75	0,75	0,25	0,5	0,75	0,75	0,5	0,5	0,25	0													
51	0,5	0,75	0,75	0,5	0,75	0,75	0,75	0,75	0,5	0,75	0,75	0,75	1	1	1	1	1	0,75	0,75	0	0,5	0,25	1	0,5	0,75	0,5	0												
52	0,5	0,75	0,75	0,5	0,75	0,75	0,75	0,75	0,5	0,75	0,75	0,75	1	1	1	1	1	0,75	0,75	0	0,5	0,25	1	0,5	0,75	0,5	0	0											
53	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	1	0,75	0,75	1	1	1	1	1	0,75	0,75	0,5	0,5	0,5	1	0,75	0,75	0,75	0,5	0,5	0										
54	0,75	0,5	0,75	0,75	0,75	0,5	0,75	0,5	0,75	1	0,75	0,75	1	0,75	1	1	0,75	0,75	0,25	0,75	1	0,75	0,5	0,75	0,25	0,25	0,75	0,75	0,75	0									
55	0,5	0,75	0,75	0,5	0,75	0,75	0,75	0,75	0,5	0,75	0,75	0,75	1	1	1	1	1	0,75	0,75	0	0,5	0,25	1	0,5	0,75	0,5	0	0	0,5	0,75	0								
56	0,75	0,75	0,5	0,75	0,5	0,75	0,5	0,75	0,75	1	0,75	0,75	1	1	0,75	0,75	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25	1	0,75	0,75	0,75	0,5	0,5	0,25	0,75	0,5	0							
58	0,75	0,5	0,75	0,75	0,75	0,5	0,75	0,5	0,75	1	0,75	0,75	1	1	1	1	1	0,75	0,75	0,25	0,75	0,25	1	0,75	0,75	0,75	0,25	0,25	0,5	0,5	0,25	0,5	0						

Distancia Genética Colectiva

El cuadro 9 muestra los valores de distancia genética obtenidos al sustraer cada uno de los clones del grupo. Esto con el fin de conocer el peso que tiene cada uno de ellos sobre el resto del conjunto. Se encontró que 13 clones tienen una distancia genética mayor al 70% con respecto al resto del grupo (30% de similitud).

Cuadro 9. Distancia genética (Gregorius, 1974) de cada clon de *V. guatemalensis* con respecto al grupo de clones.

Clon	Distancia genética
2	0,63
3	0,73
4	0,66
6	0,59
7	0,63
8	0,70
9	0,63
10	0,77
11	0,60
14	0,82
17	0,71
18	0,69
29	0,88
33	0,77
34	0,81
37	0,81
39	0,79
42	0,61
43	0,63
44	0,58
45	0,79
46	0,61
47	0,77
48	0,61
49	0,69
50	0,60
51	0,58
52	0,58
53	0,64
54	0,70
55	0,58
56	0,59
58	0,68

Análisis estadísticos

La figura 5 muestra el análisis de agrupamiento (dendrograma) de acuerdo a las distancias genéticas entre los clones, en el cual se aprecia la formación de cinco grupos. Las mayores similitudes (menores distancias) se presentan para los clones del grupo II.

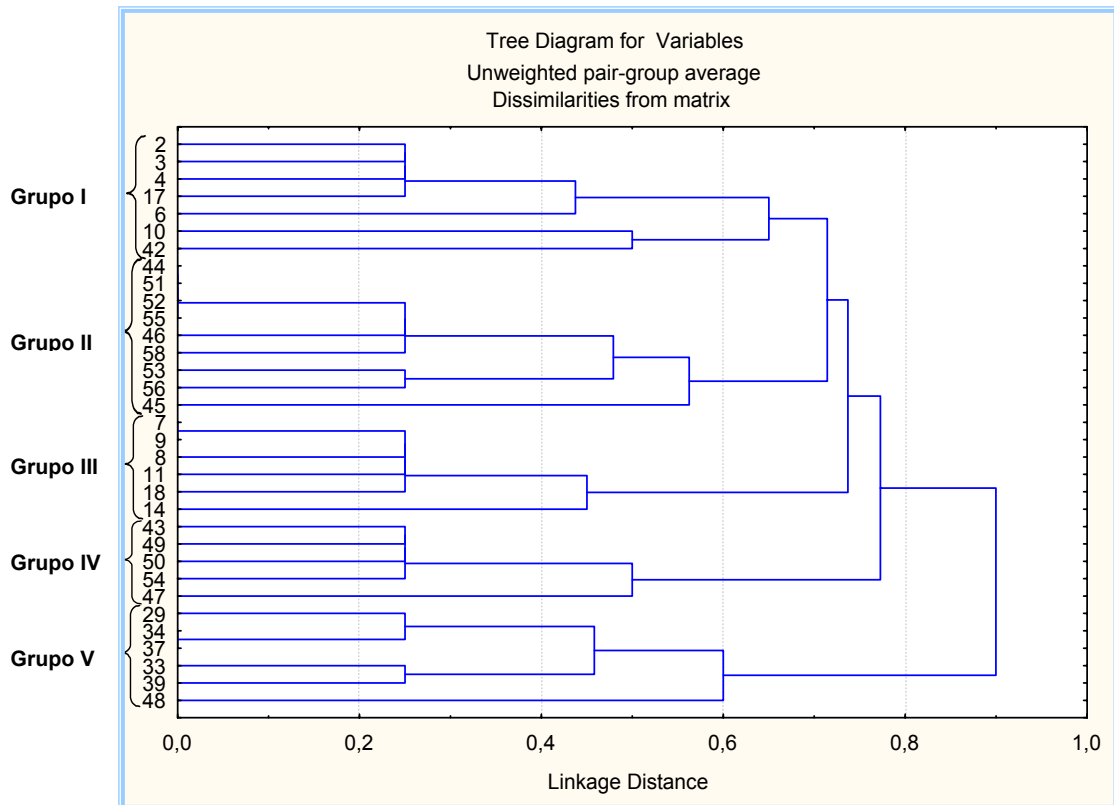


Figura 5. Dendrograma (UPGMA) basado en la matriz de distancia genética de los clones de *V. guatemalensis* que amplificaron con los loci A1-20 y A1-15.

En el análisis de ordenación (Figura 6) se muestra que la mayoría de clones tienen una buena distribución en los ejes. Se observa la formación de siete grupos en contraste con los cinco grupos formados en el dendrograma (Figura 5).

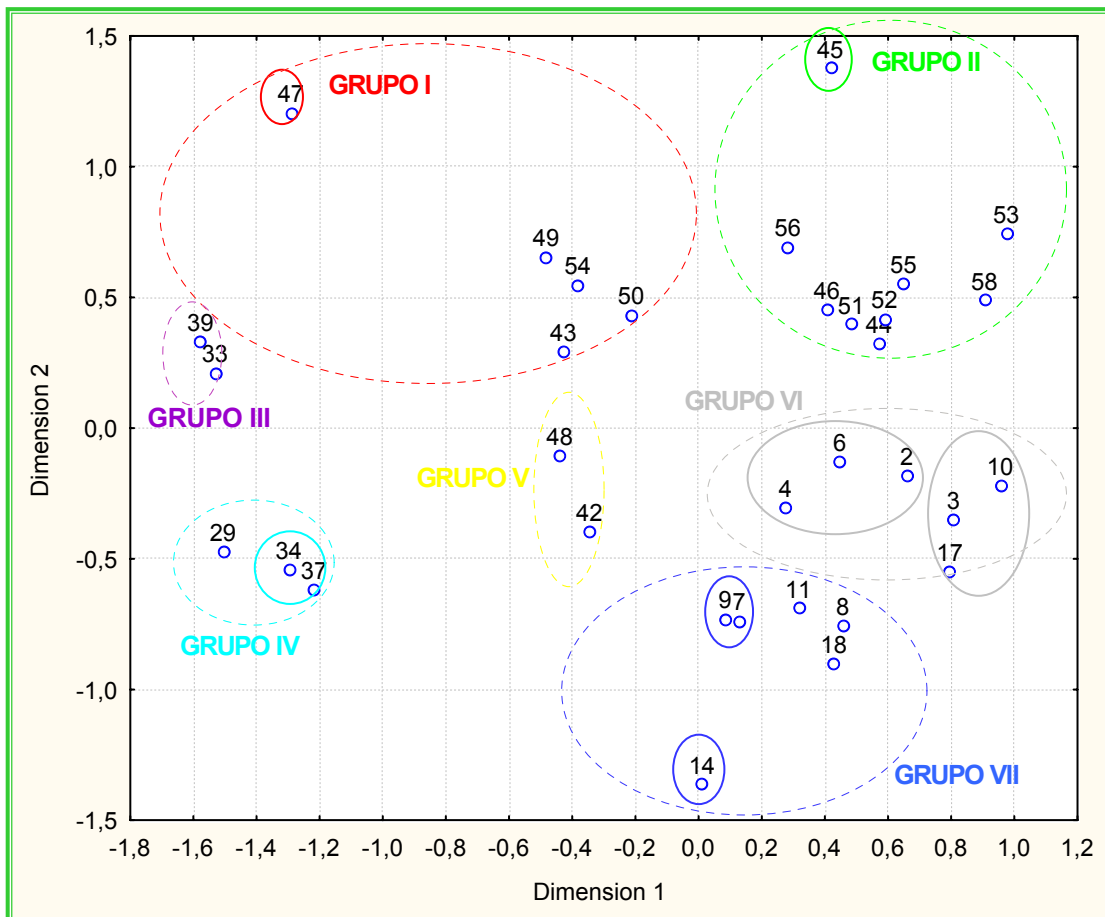


Figura 6. Análisis multivariado de ordenación “multidimensional scaling” de los clones de *V. guatemalensis* que amplificaron con los loci A1-20 y A1-15.

La línea discontinua y los distintos colores indican los diferentes grupos de clones. La línea continua indica clones que están muy separados o que están muy juntos dentro del grupo al que pertenecen.

DISCUSION

El método de extracción de ADN basado en CTAB permitió la obtención de bandas de ADN de alto peso molecular, definidas y con alta fluorescencia. Cuando las muestras fueron corridas en un gel de agarosa al 1% no se observaron barridos, lo cual indica que no hubo o que fue poca la degradación del ADN, lo que sugiere la obtención de ADN de alta calidad. Solo en algunos carriles del gel se aprecian bandas tenues que podrían indicar una menor concentración de ADN. A bajas concentraciones de sal el CTAB forma complejos con el ADN y mantiene los polisacáridos y proteínas en solución. El CTAB se asocia fuertemente al ADN debido a que posee micelas cargadas positivamente, elimina proteínas y previene la degradación del ADN (Valadez y Kahl, 2000).

La efectividad del protocolo utilizado puede ser evaluada al comparar los resultados obtenidos en *V. guatemalensis* con los resultados obtenidos por otros autores como Araya *et al.* (2004 y 2005a) con *Hyeronima alchorneoides* y *Tectona grandis* respectivamente.

Lodhi *et al.* (1994) obtuvo buenos resultados con diferentes cultivares de *Vitis*. Además el método ha sido probado en especies frutales como *Malus domestica*, *Prunus armeniaca*, *Prunus avium*, *Prunus persica*, *Prunus domestica* y *Rubus idaeus* (Lodhi *et al.*, 1994).

En resumen, la metodología de extracción de ADN evaluada es simple, eficiente y rápida, ya que una sola persona en un día de trabajo puede procesar de 30-35 muestras.

Respecto a la evaluación inicial de la PCR no se pudo determinar el tamaño de los fragmentos generados, ya que el marcador de peso molecular usado no fue el adecuado. Si se toma en cuenta que un gel de agarosa normalmente separa fragmentos que van desde 200 pb a 30 kp, mientras que un gel de poliacrilamida puede separar fragmentos menores a 200 pb y dependiendo de la concentración de la solución de acrilamida puede también

resolver fragmentos de 6-100 pb (Valadez y Kahl, 2000), por lo tanto es posible que las bandas observadas durante la evaluación inicial no fueran los fragmentos esperados, a pesar de ello no se puede descartar que los fragmentos generados no fueran los esperados, puesto que el tamaño promedio de los productos de amplificación era conocido con anterioridad. Las diferencias entre ambas matrices explica además porque en el carril donde se colocó el control en gel de agarosa (Pozo #12 de la Figura 2) no se observó ninguna banda como si sucedió al realizar las pruebas de optimización, validación y al procesar las 62 muestras en geles de poliacrilamida, ya que en los controles se pueden formar dímeros de los imprimadores que resultan ser fragmentos de bajo peso molecular que no pueden ser visualizados en geles de agarosa.

Durante la optimización de la amplificación de los microsatélites se utilizó la muestra de un solo clon con el fin de minimizar las posibles fuentes de error al evaluar las distintas temperaturas de apareamiento en el proceso de amplificación.

Con el fin de realizar la verificación de clones en *V. guatemalensis* se tomaron durante el proceso de validación dos brotes del mismo clon. Esto significa que en cada par de brotes se debe observar los mismos alelos. No obstante, es evidente como las muestras 17-18 y 19-20 en la Figura 4B y 4D no presentan el mismo patrón de bandas. Esas diferencias pueden deberse al ADN, ya que a cada uno de los brotes se les realizó la extracción de ADN por separado y solo esas muestras presentaron diferente patrón de bandas. Durante la validación se descartó además el imprimador A1-26, el cual no mostró amplificación. Mohammadi y Prasanna (2003), señalan que un problema generalmente encontrado con marcadores moleculares, particularmente con los microsatélites o SSR, es el fracaso de algunos genotipos para mostrar amplificación con algunos pares de imprimadores SSR, lo cual genera dificultades para análisis de diversidad genética. Es difícil determinar si la falta de amplificación es debida a “alelos nulos”

(Robinson y Harris, 1999). A menos que el investigador este seguro del estado nulo de un genotipo para un sitio SSR específico, los datos deben ser considerados datos perdidos al elaborar la matriz de similitud–disimilitud genética, para minimizar la posibilidad de interpretación errónea. Esto podría justificar la falta de amplificación de algunas muestras con algunos imprimadores al procesar los 62 clones e igualmente fundamentar la ausencia de amplificación con el imprimador A1-26. Se debe considerar también que la carencia de amplificación en algunas muestras pudo deberse al ADN, ya que aunque anteriormente se mencionó la obtención de ADN de alta calidad, al procesar los 62 clones se tuvieron que repetir algunas muestras y no todas tenían la misma concentración de ADN. Esto pudo afectar la Reacción en Cadena de la Polimerasa al agregar la misma cantidad de μL de ADN a la reacción de PCR, puesto que si algunas muestras tenían una menor concentración de ADN se estaba agregando una menor cantidad de éste con la que posiblemente los imprimadores no pudieron funcionar de la mejor manera.

Un ejemplo de que los mejores resultados se lograron con geles de poliacrilamida durante la validación es el hecho de que en el analizador genético ABI 310 las muestras correspondientes al locus A1-20 se observaron iguales al control (Cuadro 4); mientras que en el gel de poliacrilamida junto con el locus A1-15, fueron los loci con los que amplificó la mayor cantidad de muestras. Esto pudo deberse a un error en la corrida del analizador, ya que esas mismas muestras fueron las que se corrieron en acrilamida en donde se observaron alelos verdaderos con respecto a la banda mostrada por el control.

Basándose en el número total de alelos de cada locus se determinó que los cuatro loci analizados son polimórficos, mostrándose un ámbito de 5 a 7 alelos. Además luego de la frecuencia del alelo predominante, el resto de los alelos detectados mostraron una frecuencia mayor a 0,05.

Los loci más polimórficos reportados por Lowe *et al.* (2002) fueron el A1-20 y A1-15, estos resultados concuerdan con lo obtenido en esta investigación. El número de alelos obtenidos en ambos loci fue de 7. Estos autores indican que el número de alelos aproximado para estos loci es de 7 y 6 respectivamente. Para el caso del locus A1-20 el número de alelos obtenido por Lowe *et al.* (2002) es exactamente el mismo que se obtuvo en esta investigación y para el locus A1-15 se detectó uno más que lo indicado por dichos investigadores.

Respecto al tamaño de los alelos encontrados, se deduce que Lowe *et al.* (2002) tomaron un promedio. El promedio del tamaño de los productos obtenidos con el locus A1-20 fue de 157 pb y de 112 pb para el locus A1-15. Ambos datos difieren de lo reportado por Lowe *et al.* (2002). De los loci analizados el que más se acerca a lo conseguido por Lowe *et al.* (2002), es el locus A1-35 con un promedio del tamaño de los productos de 173 pb. Las diferencias encontradas en esta investigación con respecto a lo referido por Lowe *et al.* (2002) puede deberse a que se estudiaron especies diferentes.

El contenido de información polimórfica (PIC) es un valor comúnmente usado para medir la informatividad de un marcador genético en una población de acuerdo a la frecuencia de los alelos, además es usado en estudios de ligamiento y no depende del modo de herencia del rasgo en estudio (Guo y Lestón, 1999).

El PIC promedio encontrado fue de 0,77. Al comparar éste valor promedio de PIC con el de otros estudios como el de Fossati *et al.* (2005) donde obtuvo un PIC promedio de 0,69 y 0,37 para clones de dos cultivares distintos de álamo, se observa que el valor promedio de PIC obtenido en esta investigación es alto. En el estudio realizado por Manifesto *et al.* (2001) obtuvieron un valor de PIC promedio de 0,72 más cercano al valor obtenido en ésta investigación.

El PIC indica la variabilidad de cada locus (Manifesto *et al.*, 2001). El valor más bajo obtenido por Manifesto *et al.* (2001) fue de 0,40 y el más alto

de 0,84. No obstante en este trabajo los dos valores obtenidos fueron altos (0,83 para el locus A y de 0,72 para el locus C), lo cual evidencia una alta variabilidad en los dos loci analizados.

El locus A1-20 presenta además una mejor distribución de los alelos detectados, aunque se observa que predomina el alelo 3, las frecuencias del resto de los alelos son muy similares. Solo hay dos alelos con la misma frecuencia (alelos 2 y 6) y los alelos menos frecuentes son el 1 y 5.

En el marcador A1-15 se detectaron tres alelos con la misma frecuencia, que además son los menos frecuentes (alelos 2, 6 y 7) y un alelo predomina (alelo 1).

Esos datos de frecuencias alélicas son explicados por el valor de diversidad obtenido. La diversidad genética es una medida de la variación genética (Manifeto *et al.*, 2001). El alto valor de diversidad mostrado por el locus A (5,89) indica la mejor distribución de los alelos detectados. No así, el valor de diversidad obtenido en el locus C (3,55), indica que si se pierde el alelo 1, la población se va a ver más afectada que si se pierden los alelos 2, 6 y 7; es decir es un locus con menor variabilidad genética que el locus A.

Por otra parte, la distancia genética es una medida de la cantidad de divergencia genética entre poblaciones y es usada para agrupar poblaciones. Existen muchas estimaciones de distancia genética que usan las diferencias en las frecuencias de alelos entre poblaciones, siendo la establecida por Nei la más usada (Yeh, 2000). Sin embargo en este estudio se tiene una única población, por tanto se decidió calcular la distancia genética de otra manera.

Otros autores como Mohammadi y Prasanna (2003) indican que la distancia-similitud genética puede ser calculada entre genotipos, poblaciones o individuos mediante varias medidas estadísticas dependiendo del grupo de datos que se tenga.

El resultado mostrado en cuadro 8 coincide con el agrupamiento realizado mediante el método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method

Average) y a través del sistema de ordenación “multidimensional scaling” o MDS.

En el dendrograma puede observarse como las muestras que son tomadas como una sola corresponden a las mismas resaltadas en el cuadro 8. En la figura 6 por su parte esas mismas muestras son ordenadas de forma cercana. Dichos resultados sugieren que los clones pertenecientes a esas muestras (7-9, 34-37 y 44-51-52-55) están genéticamente muy relacionados y nos podrían estar indicando que son los mismos. Además, una prueba más de que dichos clones podrían ser los mismos son los valores mayores a 0,70 mostrados en el cuadro 9 que indican los clones que se encuentran alejados de núcleo de agrupación mostrado en la figura 6, mientras que los valores entre 0,50 y 0,70 los tienen los clones ubicados cerca del núcleo de agrupación. Los clones que se señalan podrían ser uno mismo se encuentran tanto dentro de los clones que se encuentran alejados del núcleo como de los que se encuentran cercanos a él.

Por otra parte, la huella genética para 33 clones de *Vochysia guatemalensis* permite asumir que los clones pertenecientes a las muestras antes indicadas son los mismos dado que poseen el mismo juego de alelos con los dos loci (Cuadro 7), sin embargo dos loci no son suficientes para afirmar que efectivamente son los mismo clones. La elaboración de una huella genética es sumamente importante ya que permite crear un registro genético para cada clon, el cual podría ser usado como un mecanismo de seguridad cuando se sospecha que terceros han robado material de éstos clones. La técnica de huella genética se usa para la comprobación de la identificación clonal, contaminación de los jardines clonales por individuos que no pertenecen a la colección y para corregir errores de etiquetado de los rametos dentro del jardín clonal (Araya *et al.*, 2005b).

A pesar de que la mayoría de grupos formados en el dendrograma coinciden con el ordenamiento realizado por el método “multidimensional scaling”, en el dendrograma las muestras 42 y 48 no se agrupan. El análisis

de “multidimensional scaling” (Figura 6) muestra como los clones también fueron ordenados de acuerdo a la distancia genética, por lo que es de particular interés observar que sucede lo contrario y las muestras 42 - 48 se observan cercanas. Asimismo en el análisis de ordenación la muestra 6 esta más cercana a las muestras 4 y 2 y la muestra 3 más cercana a las muestras 10 y 17. Tal agrupación es contraria en el análisis de conglomerados (dendrograma). Ello nos revela que existen diferencias entre ambos tipos de análisis.

El análisis de conglomerados es un conjunto de técnicas que se utilizan para clasificar los objetos o casos en grupos relativamente homogéneos llamados conglomerados. Los objetos en cada grupo (conglomerado) tienden a ser similares entre sí (alta homogeneidad interna, dentro del conglomerado) y diferentes a los objetos de los otros grupos (alta heterogeneidad externa, entre conglomerados) con respecto a algún criterio de selección predeterminado. Tiene como propósito esencial, agrupar aquellos objetos que reúnan idénticas características, es decir, se convierte en una técnica de análisis exploratorio diseñada para revelar las agrupaciones naturales dentro de una colección de datos (Gondar, 2000).

Por su parte, el análisis de “multidimensional scaling” (MDS) es útil para estudiar matrices de distancia/similitud, reflejando las relaciones entre un grupo de objetos, en dos o tres representaciones dimensionales de manera que los resultados pueden ser interpretados más fácilmente, ya que las proximidades entre individuos en el mapa son casi iguales a la matriz original (Skroch *et al.*, 1998; Mohammadi y Prasanna, 2003). El modelo obtenido de MDS también puede usarse para estimar el número real de grupos que pueden obtenerse por el análisis de conglomerados (Mohammadi y Prasanna, 2003).

Se puede emplear además, la matriz de distancia obtenida de un conjunto de genotipos a través de datos morfológicos, bioquímicos o moleculares como entrada para generar una representación espacial de esos

genotipos en una configuración geométrica (Thompson *et al.*, 1998; Skroch *et al.*, 1998)

Así los resultados del análisis de ordenación “multidimensional scaling” pueden considerarse más confiables. La figura 6 pone de manifiesto que la mayor variabilidad genética está contenida en los clones que constituyen el grupo VI.

A manera de resumen los resultados demuestran que dos pares de imprimadores suministraron información valiosa para distinguir los genotipos de 33 clones y su huella genética, lo que indica que los marcadores A1-20 y A1-15 pueden resultar de utilidad para la certificación, la detección de duplicados en las colecciones y para asistir programas de mejoramiento en *Vochysia guatemalensis*.

CONCLUSIONES

- ✓ Se logró la obtención de ADN de buena calidad.
- ✓ Los microsatélites resultaron ser una buena técnica para la identificación y verificación de clones.
- ✓ De los cinco loci evaluados, cuatro mostraron amplificación y solo dos fueron elegidos para los distintos análisis.
- ✓ La huella genética y los diferentes parámetros determinados fue posible solo para 33 clones de los 62 que conforman la colección total.
- ✓ Los cuatro loci analizados presentan alto grado de polimorfismo, lo cual los hace marcadores apropiados para la identificación clonal.
- ✓ A pesar de que no se pudo analizar los 62 clones, los datos generados en esta investigación son de gran valor para continuar el mejoramiento genético asistido por marcadores moleculares en *V. guatemalensis*.

RECOMENDACIONES

- ✓ Antes de realizar la extracción de ADN es aconsejable lavar el material vegetal para eliminar el mucílago.
- ✓ Se recomienda que antes de correr muestras en un analizador genético o secuenciador se tenga el protocolo de la PCR bien estandarizado.
- ✓ Con el fin de poder evaluar toda la colección de clones con los cuatro loci se deben repetir las extracciones ADN y la PCR para las muestras que no amplificaron.
- ✓ Llevar a cabo en la medida de lo posible el desarrollo de microsatélites propios para la especie.
- ✓ Evaluar otros marcadores moleculares como AFLP's y proteicos como isoenzimas con el fin de realizar análisis comparativos con los resultados obtenidos con microsatélites.
- ✓ Utilizar el resto de microsatélites reportado por Lowe *et al.* (2002).
- ✓ Cuantificar la concentración de ADN, con el fin de llevar todas las muestras a la misma concentración.

LITERATURA CITADA

- Araya, E; Murillo, O; Aguilar, G; Rocha, O. 2005a. **A DNA extraction and initial primers screening in *Hyeronima alchorneoides* Fr. All for AFLP applications.** Foresta Veracruzana 7 (1):1-4.
- Araya, E; Murillo, O; Aguilar, G; Rocha, O. 2005b. **Uso de marcadores genéticos en silvicultura clonal.** En: Seminario-Taller: Avances en Silvicultura Clonal, 26-29 Julio, 2005. San José, Costa Rica. 15 p.
- Araya, E., Murillo, O., Aguilar, G., Rocha, O. 2004. **Possibilities of breeding teak (*Tectona grandis*) in Costa Rica Assisted by AFLP markers.** In: Forests Genetics and Tree Breeding in the Age of Genomics-Progress and Future. Proceedings 2004. Eds. Li, B. y Mckeand, S. 1-5 Noviembre. Charleston, Carolina del Sur, USA. Disponible en: http://www.ncsu.edu/feop/iufro_genetics2004/proceedings.pdf
- Badilla, Y; Rodríguez, L; Murillo, O; Obando, G. 2000. **Avances en la clonación de cebo, botarrama, pilón y almendro.** Programa de Mejoramiento y Conservación Genética de Especies Forestales. ITCR/FUNDECOR. Reporte de Investigación N° 1. Cartago, Costa Rica. 11 p.
- Butterfield, R; González, E. 1996. **Adaptabilidad de diferentes especies forestales en pastizales degradados en las tierras bajas del Atlántico de Costa Rica.** Revista Forestal Centroamericana. 5(16):9-15.
- Caetano-Anollés, G; Gresshoff, P.1997. **DNA Markers: protocols, applications and overviews.** Wiley-Liss, Inc. Tennessee, US. 364 p.

CATIE. 1997. ***Vochysia guatemalensis* Donn Smith**. Nota técnica sobre manejo de semillas forestales. No 6. 2pp.

COSEFORMA (Cooperación en los Sectores Forestal y Maderero). 1999. **El Botarrama en la Zona Norte de Costa Rica (*Vochysia ferruginea*)**. San José, Costa Rica. 24 p.

COSEFORMA (Cooperación en los Sectores Forestal y Maderero). 2001. **El Cebo en la Zona Norte de Costa Rica**. San José, Costa Rica. 40 p.

Delgado, A; Montero, M; Murillo, O; Castillo, M. 2003. **Crecimiento de especies forestales nativas en la zona norte de Costa Rica**. Agronomía Costarricense 27(1):63-78.

Demey, J; Zambrano, A; Fuenmayor, F; Segovia, V. 2003. **Relación entre caracterizaciones molecular y morfológica en una colección de yuca**. Interciencia 23 (12):684-689.

Di Stéfano, J; Fournier, L. 1998. **Biomasa aérea, concentración de nutrimentos y daños en árboles de *Vochysia guatemalensis* en un monocultivo de cuatro años, Tabarcia, Costa Rica**. Agronomía Costarricense 22(2):235-241.

Flores, E. 1993. ***Vochysia guatemalensis*, *Vochysia ferruginea* y *Hyeronima alchorneoides***. Árboles y Semillas del Neotrópico. 2(2):1-28.

Fossati, T; Zapelli, I; Bisoffi, S; Micheletti, A; Vietto, L; Sala, F; Castiglione, S. 2005. **Genetic relationships and clonal identity in a collection of**

commercially relevant poplar cultivars assessed by AFLP and SSR.
Tree Genetics y Genomes 1:11–19

Glaubitz, J; Moran, G. 2000. **Genetic tools: the use of biochemical and molecular markers.** In: Young, A; Boshier, D y Boyle, T (eds). Forest Conservation Genetics, Principles and Practice. Collingwood, AU. CSIRO Publishing. 352 p.

Goldstein, D; Schlotterer, C. 1999. **Microsatellites. Evolution and Applications.** Oxford University Press Inc. New York, United States. 352 p.

Gondar, J. 2000. Artículos Estadísticos. **DATA MINING INSTITUTE, S.L.** Madrid, España. Disponible en: <http://www.estadistico.com/arts.html>

Guo, X; Lestón, R. 1999. **Linkage Information Content of Polymorphic Genetic Markers.** Hum Hered 49:112–118.

Gregorius, H.R. 1978. **The concept of genetic diversity and its formal relationship to heterozygosity and genetic distance.** Math. Biociences 41:253-271.

Haines, R. 1994. **La biotecnología en le mejoramiento de especies arbóreas forestales: tendencias y prioridades de la investigación.** Unasyva 45:46-52.

Lefort, F; Echt C; Streiff, R; Vendramin, G. 1999. **Microsatellite Sequences: a new generation of molecular markers for forest genetics.** Forest Genetics 6 (1):15-20.

- Lodhi, M; Ye, G; Weeden, N; Reisch, B. 1994. **A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species.** Plant Molecular Biology Reporter 12:6-13.
- Lowe, A; Goodall-Copestake, W; Caron, H; Kremer, A; Decroocq, S. 2002. **A set of polymorphic microsatellites for *Vochysia ferruginea*, a promising tree for land reclamation in the Neotropics.** Molecular Ecology Notes 2:153-155.
- Manifesto, M; Schlatter, A; Hopp, H; Suárez, E; Dubcovsky, J. 2001. **Quantitative Evaluation of Genetic Diversity in Wheat Germplasm Using Molecular Markers.** Crop Sci. 41:682–690.
- Mesén, F; Trejos E. 1997. **Propagación Vegetativa del San Juan (*Vochysia guatemalensis* Donn. Smith) mediante enraizamiento de estacas juveniles.** Revista Forestal Centroamericana. 6(21):19-24.
- Mohammadi, S.A; Prasanna, B.A. 2003. **Analysis of Genetic Diversity in Crop Plants—Salient Statistical Tools and Considerations.** Crop Sci 43:1235–1248.
- Montagnini, F. 2004. **Plantaciones forestales con especies nativas: una alternativa para la producción de madera y la provisión de servicios ambientales.** Recursos Naturales y Ambiente. 43:28-35.
- Murillo, O; Rojas, J; Badilla, Y. 2001. **Reforestación Clonal.** Taller de publicaciones del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. 32 p.

- Peréz, J; Bornemisza, E; Sollins, P. 1993. **Identificación de especies forestales acumuladoras de aluminio en una plantación forestal experimental ubicada en Sarapiquí, Costa Rica.** Agronomía Costarricense 17(2):99-103.
- Robinson, J y Harris, S. 1999. **Amplified fragment length polymorphisms and microsatellites: a phylogenetic perspective.** In: E.M. Gillet (ed.) Which DNA marker for which purpose? Final Compendium of the Research Project Development, Optimisation and Validation of Molecular Tools for Assessment of Biodiversity in Forest Trees in the European Union. Disponible en: <http://webdoc.sub.gwdg.de/ebook/y/1999/whichmarker/index.htm>
- Schuelke, M. 2000. **An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. A poor man's approach to genotyping for research and high-throughput diagnostics.** Nature Biotechnology 18:233-234.
- Skroch, P; Nienhuis, J; Beebe, S; Tohme, J; Pedraza, F. 1998. **Comparison of Mexican Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Core and Reserve Germplasm Collections.** Crop Sci. 38:488-496.
- Thompson, J; Nelson, R; Vodkin, L.. 1998. **Identification of Diverse Soybean Germplasm Using RAPD Markers.** Crop Sci. 38:1348-1355.
- Valadez, E; Kahl, G. 2000. **Huellas de ADN en genomas de plantas: teoría y protocolos de laboratorio.** Mundi-Prensa, S.A de C.V. México, D.F. 147 p.

Yeh, F. 2000. **Population genetics**. In: Young, A; Boshier, D y Boyle, T (Eds). Forest Conservation Genetics, Principles and Practice. CSIRO Publishing. 352 p.

Zaeser, D. 1996. **Comportamiento temprano de familias de progenies de Melina producido por polinización abierta entre clones de árboles plus en Huerto Semillero**. En: III Taller Nacional Forestal y Agroforestal, 14-16 noviembre, 1995. Hacienda La Pacífica, Cañas, Guanacaste. 7 p.

Zobel, B. 1993. **Clonal Forestry in the Eucalypts**. In: Ahuja y Libby (eds.). Clonal Forestry II, Conservation and Application. Springer-Verlag Berlín: pp 139-148.

Apéndice 1. Número de muestra asignada a cada número de clon.

Número de muestra	Número de clon	Número de muestra	Número de clon	Número de muestra	Número de clon	Número de muestra	Número de clon
1	200-5	19	41-3	37	39-1	55	19-6
2	103-4	20	19-3	38	103-5	56	119-2
3	41-4	21	200-6	39	104-2	57	102-1
4	101-3	22	33-1	40	200-7	58	200-4
5	200-1	23	120-6	41	101-5	59	102-3
6	120-3	24	19-2	42	101-6	60	103-7
7	200-2	25	200-8	43	101-1	61	104-3
8	120-4	26	102-2	44	104-1	62	39-3
9	101-8	27	103-6	45	119-1		
10	120-1	28	39-4	46	39-2		
11	120-5	29	102-5	47	101-2		
12	104-7	30	120-7	48	19-8		
13	103-8	31	104-6	49	36-1		
14	103-2	32	104-4	50	103-1		
15	19-5	33	41-2	51	19-7		
16	104-8	34	19-4	52	19-1		
17	120-8	35	200-3	53	30-1		
18	104-5	36	120-2	54	101-4		

Nota: Cada color corresponde a los clones que podrían ser el mismo.