

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA CON MICROSATÉLITES DE UN ENSAYO DE
PROGENIE DE TECA (*Tectona grandis* Linn f) EN SAN MATEO DE
ALAJUELA**

Byron González Aguilar.

CARTAGO, 2007

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA CON MICROSATÉLITES DE UN ENSAYO DE PROGENIE DE TECA (*Tectona grandis* Linn f) EN SAN MATEO DE ALAJUELA

Byron González Aguilar.*

RESUMEN

La teca (*Tectona grandis* Linn F) es una especie forestal originaria del sudeste asiático, la cual, debido a las buenas propiedades de su madera, ha sido establecida en plantaciones por todo el mundo tropical. Según la región, se han visto diferencias en la calidad del tronco, así como en la tasa de crecimiento por lo que ha surgido la necesidad de determinar si esa variabilidad se da a nivel genético, de allí que se usen marcadores moleculares para determinar la diversidad genética de poblaciones, así como para permitir la identificación de individuos mediante el establecimiento de su huella genética. Se analizó genotípicamente un ensayo de progenie de 7 años de edad compuesto por 27 familias utilizando 7 microsatélites. El ensayo se encuentra en el asentamiento del Instituto de Desarrollo Agrario (IDA), Oricuajo, Labrador de San Mateo, Alajuela y forma parte del Programa de Mejoramiento Genético del Centro Agrícola Cantonal de Hojanca (CACH).

Solamente se pudo obtener datos con 3 pares de imprimadores (TG-AC01, TG-AG16 y TG-ATC02) con los que se registró un promedio de 8,33 alelos por locus. El Contenido de Información Polimórfica (PIC) tuvo un valor promedio de 0,64, lo cual indica que los loci son bastante polimórficos, siendo el locus TG-AG16 el más variable con un valor de PIC de 0,73. Sin embargo, ese locus presenta un valor de diversidad genética bajo (3,7) si se compara con otros estudios. Aunque es el locus más alto si se compara con los otros dos locus (TG-AC01 y TG-ATC02), con valores de diversidad de 2,3 y 2,7; respectivamente. Se evidencia de esa forma que el locus TG-AG16 presenta una mejor distribución de las frecuencias alélicas.

Se determinó la huella genética (Fingerprint) de los individuos muestreados (3 por cada familia) pero en sólo 51 fue completa. Con esos individuos se estableció una matriz de distancia genética (parentesco) a partir de la cual se hizo un análisis de escalamiento multidimensional (MDS por sus siglas en inglés) en el que se vio un claro agrupamiento de familias, lo cual sugiere un alto parentesco de la población investigada. La mayor limitante de esta investigación fue la utilización de solamente tres loci, lo cual no permite establecer conclusiones definitivas sobre la población investigada.

Palabras claves: *Tectona grandis*, microsatélites, marcadores genéticos, mejoramiento genético, diversidad genética, San Mateo.

*INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN. Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2007.

Genetic characterization in a teak (*Tectona grandis* Linn. f.) progeny test at San Mateo, Alajuela, through microsatellites

Byron González Aguilar.*

ABSTRACT

Teak (*Tectona grandis* Linn F) is a tree species native in southeast Asia, with an outstanding wood quality, that has motivated its planting throughout the tropics. Growth and stem quality differences have been recorded as related to its geographical origin. Therefore, it is important to determine how much from this natural variation is due to its genetic background. Gene markers have been then used in this research, in order to determine its genetic diversity as well as its genetic fingerprinting. A 7-year-old progeny test, conformed by 27 families, was investigated through seven microsatellites. The genetic test was established in a Small Farmers Land Development Agency (IDA) parcel, located in Oricuajo, Labrador, San Mateo, in Alajuela province. This genetic test belongs to the Small Farmers Hojanca Organization (CACH) teak breeding program.

Genetic analyses was performed only in 3 pairs of microsatellites (TG-AC01, TG-AG16 y TG-ATC02), which registered an average of 8.33 alleles per locus. The Polymorphic Information Content (PIC) registered an average of 0.64, which represents a high polymorphic value. Locus TG-AG16 was found as the most variable with a PIC of 0.73. Its genetic diversity value (3.7) is lower if compared with other studies, however, it was the highest in relation to the other two loci (TG-AC01 y TG-ATC02), which registered 2.3 y 2.7 diversity values respectively. This genetic diversity value for TG-AG16 means that it exhibits the best allelic distribution.

Fingerprint with the three loci in 51 individuals (3 by family) was performed. A genetic distance matrix was constructed as well as a multidimensional scaling (MDS), which showed a clear family grouping. This results suggest a high genetic inbreeding within this population. Analyses based on only three loci was the major shortage of this study, which prevent from the establishment of conclusive statements about the investigated population.

Key words: *Tectona grandis*, breeding, microsatellite, genetic diversity, gene markers, San Mateo.

*GRADUATION FINAL WORK REPORT. Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2007.

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA CON MICROSATÉLITES DE UN ENSAYO DE
PROGENIE DE TECA (*Tectona grandis* Linn f) EN SAN MATEO DE
ALAJUELA**

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 Olman Murillo, Ph.D.
Asesor-ITCR

Biólogo Johnny Peraza, MSc.
Asesor-ITCR

Ingeniera Fabiana Rojas, B.Sc.
Lectora

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|----|
| RESUMEN | 2 |
| ABSTRACT | 3 |
| ACREDITACIÓN | 4 |
| ÍNDICE GENERAL | 5 |
| ÍNDICE DE CUADROS | 7 |
| ÍNDICE DE FIGURAS | 8 |
| INTRODUCCIÓN | 9 |
| REVISIÓN DE LITERATURA | 11 |
| Descripción de la especie | 11 |
| Nombres comunes | 11 |
| Distribución natural y artificial | 11 |
| Descripción Botánica | 12 |
| <i>Descripción del árbol y corteza</i> | 12 |
| <i>Flores</i> | 12 |
| <i>Fruto</i> | 13 |
| <i>Hoja</i> | 13 |
| Condiciones de crecimiento y factores limitantes | 13 |
| Propiedades y usos de la madera de <i>T. grandis</i> | 15 |
| Marcadores genéticos: generalidades y tipos | 16 |
| Marcadores Moleculares | 17 |
| Microsatélites | 19 |
| Usos y aportes de los marcadores moleculares en el mejoramiento de especies forestales | 21 |
| OBJETIVOS | 24 |
| OBJETIVO GENERAL | 24 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 24 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 24 |
| Obtención y manejo del material vegetal | 25 |
| Extracción de ADN a partir de hojas de <i>T. grandis</i> | 25 |
| Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para microsatélites en <i>T. grandis</i> | 27 |
| Visualización de los productos de PCR en geles de poliacrilamida | 29 |
| Análisis de datos de los microsatélites | 29 |
| Tamaño de los alelos | 29 |
| Determinación de las frecuencias alélicas | 30 |
| Determinación de la huella genética (Fingerprint) | 30 |
| Diversidad y distancias genéticas | 30 |
| Diversidad genética | 30 |
| Distancia genética (parentesco) | 30 |
| Análisis estadísticos | 31 |
| RESULTADOS | 31 |
| Extracción de ADN a partir de hojas de <i>T. grandis</i> | 31 |
| Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para microsatélites en <i>T. grandis</i> | 32 |
| Visualización de los productos de PCR en geles de poliacrilamida | 33 |

| | |
|--|----|
| Análisis de datos de los microsatélites | 35 |
| Tamaño y frecuencia de los alelos..... | 35 |
| Determinación de la huella genética (Fingerprint)..... | 35 |
| Diversidad genética | 37 |
| Distancia genética (parentesco). | 39 |
| Análisis estadístico. | 39 |
| DISCUSIÓN | 41 |
| CONCLUSIONES | 53 |
| RECOMENDACIONES | 53 |
| LITERATURA CITADA..... | 54 |
| APÉNDICES. | 62 |
| Apéndice 1. Diseño del ensayo de progenie de teca (<i>Tectona grandis</i>), ubicado en San Mateo de Alajuela | 62 |
| Apéndice 2. Resultados de cuantificación de ADN y proteínas en muestras de <i>T.grandis</i> | 63 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | |
|---|----|
| Cuadro 1. Mezcla de PCR utilizada en microsatélites de <i>T.grandis</i> | 27 |
| Cuadro 2. Perfil térmico o condiciones de PCR para la amplificación de microsatélites en <i>T.grandis</i> | 28 |
| Cuadro 3. Imprimadores utilizados para amplificar las secuencias simples repetidas (SSR) de <i>T.grandis</i> | 28 |
| Cuadro 4. Número y tamaño de los alelos identificados para 3 loci en un ensayo de progenie de <i>T.grandis</i> | 35 |
| Cuadro 5. Huella genética de 51 individuos de <i>T.grandis</i> obtenidas a partir del análisis con 3 microsatélites..... | 36 |
| Cuadro 6. Frecuencias alélicas, diversidad genética y contenido de información polimórfica obtenidos con 3 pares de microsatélites en <i>T.grandis</i> | 38 |
| Cuadro 7. Matriz de distancia genética obtenida en un ensayo de progenie de <i>T.grandis</i> con 3 microsatélites..... | 40 |

ÍNDICE DE FIGURAS.

| | |
|---|----|
| Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1%..... | 31 |
| Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % con productos de PCR utilizando el imprimador TG-AC01..... | 32 |
| Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1.6 % con productos de PCR de los 7 imprimadores analizados para <i>T. grandis</i> | 33 |
| Figura 4. Visualización de productos de PCR utilizando 3 pares de imprimadores de microsatélites en <i>T.grandis</i> | 34 |
| Figura 5. Escalamiento multidimensional (MDS) a partir de la distancia genética en un ensayo de progenie de <i>T.grandis</i> | 41 |

INTRODUCCIÓN

La teca (*Tectona grandis* Linn F) es un árbol decíduo que puede alcanzar una altura máxima de 30-40 m y un diámetro de hasta 2 m; aunque en términos generales presentan una tasa moderada de crecimiento. Esta especie tropical es originaria del sudeste asiático y tolera una gran cantidad de climas, pero crece mejor en los climas tropicales húmedos con una marcada temporada seca (3-6 meses), de allí que se encuentren plantaciones de esta especie en África y América Latina, donde se ha introducido como especie exótica desde principios del siglo pasado (Francis, 2003; Araya *et al*; 2005b).

Es de gran valor comercial debido a ciertas características de su madera como lo son su fuerza, durabilidad y estabilidad. Por lo tanto, es muy usada en la construcción de barcos, muebles finos, objetos decorativos, astas y como combustible (Francis, 2003; Araya *et al*; 2005b).

En lo que se refiere a características botánicas, sus flores son pequeñas, blancas y perfectas. La floración se presenta aproximadamente 2 meses luego de finalizar la temporada lluviosa y esta especie produce semillas viables a partir de los 3 años. Las mejores cosechas de semillas son obtenidas en plantaciones no mayores a 20 años (Francis, 2003).

A pesar de que *T. grandis* no está dividida en subespecies o variedades, en las distintas regiones donde está distribuida, es fácil distinguir diferencias entre las poblaciones. De allí que se hayan empezado a realizar programas de mejoramiento genético así como estudios de caracterización de las poblaciones utilizando marcadores genéticos, los cuales pueden ayudar en forma significativa en estos programas de mejoramiento (Araya *et al*, 2005b; Kjær & Siegismund, 1996). En términos generales, un marcador genético es una característica heredable y fácilmente observable, utilizado con el objetivo de seleccionar otra característica menos fácil de apreciar (Claros, 1998).

Estos marcadores pueden clasificarse según los criterios de selección en morfológicos, bioquímicos y moleculares, siendo estos últimos los que actualmente se usan con mayor frecuencia, pues al analizar variaciones del ADN en forma directa mediante técnicas como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), presentan una menor incertidumbre (Claros, 1998).

Uno de los campos donde el análisis de marcadores moleculares ha tenido gran éxito es el de las ciencias forestales, puesto que en el mejoramiento genético forestal, se requieren realizar ensayos genéticos en campo que abarcan periodos de hasta 10 años, sólo para la evaluación y verificación de los árboles plus. Estas pruebas están basadas en la expresión fenotípica y no se puede saber con certeza si los individuos utilizados en un programa de mejoramiento tienen el genotipo deseado. Por lo tanto, una selección de ciertas características, como la tasa de crecimiento y la calidad de la madera, asistida por marcadores moleculares junto con ensayos de progenie, podrían permitir obtener resultados más rápidos y exactos (Araya *et al*; 2003). Por otro lado, el uso de marcadores moleculares tiene varias aplicaciones en el mejoramiento genético, como lo son la verificación de identidad genética del material en evaluación, la evaluación de la relación genética entre clones dentro de una población, el aseguramiento ante usurpación de material genético y una posible selección temprana así como la cuantificación de la variabilidad genética del material (Araya *et al*; 2005a).

La diversidad genética de una especie puede estudiarse tanto a nivel de individuo (dada por la frecuencia relativa de los alelos) como en términos poblacionales, definida por el tipo y frecuencia de los alelos en una población dada y entre poblaciones distintas, para conformar así la estructura genética de una población (Nason, 2002). Por otro lado, la distancia genética (parentesco) se puede definir como la diferencia descrita por la variación alélica entre dos entidades, o sea es cualquier medida cuantitativa de la diferencia genética que, generalmente, se estima usando diferencias en las frecuencias de alelos de una población; sin embargo, ésta también se puede calcular entre genotipos, poblaciones o individuos (Mohammadi & Prasanna, 2003). En el caso de *T. grandis*, la variedad de condiciones dentro de las cuales puede crecer sugiere la probabilidad de diferencias genéticas presentes en los puntos de origen de la semilla, haciendo necesaria este tipo de caracterización (Kjaer & Foster, 1996).

Debido a la necesidad de una adecuada caracterización de las poblaciones de *T. grandis* y a las facilidades que ofrecen los marcadores moleculares para ello, la presente investigación consiste en la caracterización genética de individuos que forman parte de un ensayo de progenie de *T. grandis* utilizando

microsatélites como marcadores para determinar su diversidad y distancia genética.

REVISIÓN DE LITERATURA

Descripción de la especie

La teca (*Tectona grandis* Linn F) es un árbol caducifolio de gran tamaño perteneciente a la familia *Verbenaceae* originario del sudeste asiático, en donde puede alcanzar alturas de hasta 45 m y un diámetro de 2 m. A pesar de que las características de las poblaciones pueden variar según la región (diferencias en la forma del tronco y en la tasa de crecimiento), se considera una sola especie (Weaver, 1993; Fonseca, 2004).

Nombres comunes

En la mayoría de los países donde se ha introducido es conocida como Teca o Teak (en inglés), sin embargo, sus nombres varían según el país o región. Por ejemplo, en India se le denomina sagun, sagon, sagan, skhu, toak, shilp tru, o Indian oak, o Teck (como se le conoce también en Francia, Inglaterra y Holanda). En Indonesia se le llama jati, deleg y kulidawa. En Birmania es conocida como Kyun, y en Laos y Tailandia se le llama sak y mai-sak, respectivamente (Fonseca, 2004).

Distribución natural y artificial

Esta especie crece naturalmente en el sudeste de Asia abarcando la mayoría de la India, gran parte de Myanmar así como regiones de Laos y Tailandia. A partir de esas regiones se introdujo en algunas islas de Indonesia y en Filipinas. Se tienen reportes de que las primeras plantaciones de *T. grandis* se establecieron alrededor de 1840 y que veinte años después ya se estaba iniciando la introducción de la especie en América, principalmente en la región caribeña (Weaver, 1993). Sin embargo, Fonseca (2004) señala su introducción en América tropical entre 1913 y 1916 en Trinidad, a partir de semillas procedentes de Myanmar. En Costa Rica se introdujo esta especie en 1926, siendo Sri Lanka

el origen de la semilla, y a partir de esta procedencia se enviaron semillas al resto de Centroamérica y el Caribe (Francis, 2003; Fonseca, 2004).

Actualmente se encuentran plantaciones en Belice, Colombia, Costa Rica, Cuba, Venezuela, Panamá, Ecuador, entre otros, sin olvidar su presencia también en el archipiélago Hawaiano y en África como en Cercano Oriente (Weaver, 1993).

Descripción Botánica

Descripción del árbol y corteza

T. grandis es un árbol de fuste recto que presenta dominancia apical, la cual se pierde con la madurez o al florecer a edades tempranas, produciendo una copa más amplia con numerosas ramas. Respecto a su corteza, es áspera, fisurada, de color café claro y defolia en placas grandes y delgadas (Fonseca, 2004).

Esta especie cuenta con una raíz pivotante gruesa y larga que puede desaparecer o persistir en su desarrollo, sin embargo, produce muchas raíces laterales fuertes sensibles a la deficiencia de oxígeno, por lo que se encuentran a poca profundidad (aproximadamente 30 cm) y crecen en suelos bien drenados (Fonseca, 2004).

Flores

Son monoicas, perfectas y se presentan en panículas erectas y ramificadas en forma terminal, de 45 a 60 cm de largo. Están cubiertas de tricomas finos, y su cáliz es acampanado, gris y posee seis lóbulos, mientras que su corona es blanquecina, en forma de embudo con un tubo corto y seis lóbulos extendidos. El tubo corolar tiene seis estambres insertos, mientras que su pistilo está conformado por un ovario de cuatro células, un estilo delgado y un estigma de dos lóbulos (Weaver, 1993).

En términos generales, la floración se produce aproximadamente 2 meses luego de finalizada la estación seca, sin embargo, esto puede variar según la región climática, por ejemplo, en América Central, el proceso ocurre entre los meses de junio y septiembre de manera que los frutos maduran entre febrero y

abril del siguiente año. La polinización es cruzada (la auto incompatibilidad es muy alta y puede producir semillas de pobre germinación). Entre sus principales polinizadores se encuentran las especies de abejas *Heriades parvula* y *Ceratina hieroglyphica* (Weaver, 1993; Francis, 2003).

Fruto.

Consiste en una drupa subglobosa de cuatro lóbulos, parda y con finas vellosidades, presenta un endocarpo duro con cuatro semillas o menos y presenta una cavidad central que da la apariencia de una quinta célula. Cada una de las semillas mide 0,6 cm de largo, aproximadamente y su madurez se evidencia cuando el involucro cambia su color de verde a café (Weaver, 1993; Francis, 2003, Fonseca, 2004).

Las semillas se consideran ortodoxas respecto a su forma de conservación, pues se conservan mejor a condiciones bajas de humedad y temperatura, se ha reportado que han soportado por más de 7 años almacenadas entre 0-4 °C y con una humedad del 12% (Francis, 2003; Weaver, 1993).

Hoja.

Las hojas son simples, opuestas, de 11 a 85 cm de largo y de 6 a 50 cm de ancho, además presenta pecíolos gruesos (Fonseca, 2004).

Condiciones de crecimiento y factores limitantes

A pesar de su tolerancia a gran variedad de climas, crece mejor en condiciones moderadamente húmedas y calientes, siendo la cantidad de lluvia óptima para esta especie en el rango de 1500 a 2000 mm por año, sin embargo puede tolerar rangos entre los 500 y 5100 mm por año. Las sequías extremas pueden disminuir severamente las poblaciones de esta especie, mientras que condiciones muy húmedas pueden provocar mayor crecimiento y producción de madera de menor calidad, debido a un porcentaje mayor de albura, una textura pobre, color menos atractivo, así como por la pérdida de fuerza y una densidad menor (Weaver, 1993; Fonseca, 2004).

Con respecto a las temperaturas, tolera grandes variaciones (2-48 °C), pero se ha propuesto que el clima óptimo para *T. grandis* es el de la costa

occidental de la India (16-40°C). No obstante, se considera que para su desarrollo óptimo, la temperatura media debe ser de 25 °C (rango de 24-30 °C). No obstante, esta especie también se extiende a áreas donde se presentan ligeras heladas. En Costa Rica se encuentra desde climas secos hasta muy húmedos con temperaturas de hasta 38 °C con promedios anuales de 23 y 27°C. (Weaver, 1993; Fonseca, 2004).

En lo que se refiere a suelos, *T. grandis* se adapta a gran cantidad de suelos, pero prefiere suelos planos, aluviales, de textura franco-arenosa o arcillosa, profundos (profundidad efectiva mayor a 80 cm), fértiles, con un pH neutro o ácido (siempre y cuando haya buen drenaje). Requiere mucha cantidad de elementos como calcio, fósforo y magnesio, siendo en Costa Rica los suelos de la región Chorotega los de mayor calidad para el establecimiento de plantaciones, planos, profundos, bien drenados y con concentraciones de calcio mayores a 10 meq/100 g de suelo en los primeros 20 cm de profundidad, con precipitaciones mayores a 2000 mm/año (Fonseca, 2004).

En términos generales, los mejores sitios son aquellos con una pendiente menor al 25 %, al pie de monte o en el fondo de valles. En lo referente a altitud, en Costa Rica se han logrado los mayores crecimientos en sitios menores a 500 msnm (Weaver, 1993; Fonseca, 2004).

Los factores limitantes para el crecimiento de la teca en lo que se refiere a suelos son la poca profundidad, las capas duras, las condiciones anegadas, los suelos compactos o arcillas densas con un bajo contenido de calcio o magnesio así como de fosfatos. De igual manera, las pendientes escarpadas (mayores al 30% causan problemas de erosión), un drenaje pobre y alturas mayores a 1000 msnm influyen negativamente sobre su crecimiento. Asimismo, no se aconsejan sitios con distribución de lluvias en lapsos muy cortos o con un veranillo muy largo, pues esto último provoca la tendencia a botar las hojas dos veces por año. También requiere de un espacio amplio alrededor para el desarrollo apropiado y es muy sensible a la competencia radical ocasionada por las malezas y a los fuertes vientos (Weaver, 1993; Fonseca, 2004).

Propiedades y usos de la madera de *T.grandis*

El duramen de la teca empieza a formarse durante el tercer año, cambiando su color de verde olivo a pardo oscuro con el secado, además, es resistente a termitas de madera seca (*Kaloterms flavicolis*) y a las termitas subterráneas (*Reticulitermes banyulensis*), pero la polilla del mar (*Teredo sp*) lo ataca. Su albura es amarillenta o blanquecina y no presenta resistencia a estos organismos. Es una madera de fibra recta, textura mediana de forma uniforme y aceitosa al tacto, la cual puede secarse rápidamente al aire con una torcedura menor, aunque también se puede usar un horno, pero el proceso es lento y se producen algunas rajaduras o torceduras mínimas (Weaver, 1993).

La madera es moderadamente dura y pesada, de contracción poca y uniforme, además, se trabaja bien con herramientas eléctricas o manuales, sin embargo, el filo de los instrumentos puede disminuir pues esta madera contiene sílice. Se considera como una madera resistente a la mayoría de patógenos de las plantaciones; así como a la pudrición (según la cantidad de ciertas sustancias contenidas en la madera). Se considera resistente al fuego cuando los incendios avanzan rápido y las temperaturas no son muy altas, pero si la corteza aún no es lo suficientemente gruesa, el daño puede ser permanente (Weaver, 1993).

La madera de *T. grandis* tiene buena durabilidad y estabilidad dimensional, además, no produce corrosión al estar en contacto con metal, debido a aceites naturales antisépticos, los cuales también le dan la resistencia ante termitas y hongos, como se mencionó anteriormente. Esta madera es apta para el cepillado, moldurado, atornillado, clavado, lijado y perforación, sus condiciones de trabajabilidad son buenas, es fácil de aplicarle acabados, así como de encolar y recibe bien el barniz, las pinturas, los tintes y los selladores (Fonseca, 2004).

La proporción del duramen es del 55 % a los 30 años y aumenta en forma logarítmica con la edad por lo que también aumenta el diámetro; sin embargo, ésta no es la única propiedad que aumenta con el tiempo, pues también lo hace la densidad de la madera, la razón de contracción y las propiedades mecánicas. A pesar de la calidad de esta madera, hay discrepancias acerca de cómo varía ésta según aumenta su grosor y altura. En algunos casos no se ha visto diferencia en las propiedades de la madera conforme estos parámetros aumentan. Se ha detectado que cerca de la médula su resistencia es menor (Fonseca, 2004).

Últimamente se discute si las propiedades de la madera proveniente de las plantaciones son inferiores a las mostradas en el bosque natural, (hecho supuestamente causado por el corte de los árboles a menor edad), pues en madera de plantaciones la durabilidad se ve reducida, su color es más apagado, es una madera más clara y más uniforme, menos aceitosa a la vista y menos agradable al tacto. Sin embargo, otros estudios contradicen estas conclusiones (Fonseca, 2004).

Entre los principales usos que se le ha dado a la madera de esta especie se encuentran la construcción de casas, puentes, muelles, pilotes, vagones de tren y rayos de rueda. Es la única madera aceptable para las cubiertas en barcos de tamaño considerable, debido a su estabilidad. También se ha usado para la fabricación de artículos que van desde pipas hasta pianos así como combustible (Weaver, 1993; Francis 2003).

También es importante mencionar que se han realizado estudios preliminares para evaluar la posibilidad de producir papel a partir de *T. grandis*, con resultados positivos. Además, a partir de la corteza se pueden obtener compuestos de importancia industrial como el ácido oxálico y sus taninos, que también están en las hojas y se pueden utilizar para teñir la seda y una vez cocinadas las hojas, se usan como tratamiento en contra de desórdenes y hemorragias menstruales, así como enjuague bucal (Weaver, 1993).

Marcadores genéticos: generalidades y tipos

Los marcadores genéticos son características relacionadas con un rasgo genético y cuya expresión es discernible, lo cual permite identificar individuos que presentan un determinado genotipo. Esta característica es invariable en los genomas que se estudian (marcadores monomórficos) o puede presentar diferencias entre individuos de una misma especie, conocidas como polimorfismos (Claros, 1998).

Los marcadores genéticos pueden dividirse en 3 grupos: marcadores morfológicos, marcadores bioquímicos y marcadores moleculares. Con respecto a los morfológicos, son los que se usaban tradicionalmente para estudios de genética y de mejoramiento, pues estos marcadores se basan en genes asociados a caracteres morfológicos fácilmente identificables a nivel visual. No

obstante, presentan las desventajas de que son poco numerosos y hay muchas posibilidades de interferencia epistática (interacciones entre genes) o ambiental, por lo que su uso es limitado (Yáñez, 2002).

Los marcadores bioquímicos son los que se basan en el análisis de compuestos orgánicos de los seres vivos tales como terpenos, alcaloides o proteínas (isoenzimas), siendo éstos últimos los más usados dentro de esta categoría. A pesar de que se aumentó el número de marcadores disponibles y su aplicación se extendió a muchas especies vegetales, al ser productos de genes, también pueden verse influidos por diferentes factores, como la epistasis y la redundancia del código genético. Finalmente, se encuentran los marcadores moleculares, los cuales se basan en variaciones del ADN (Yáñez, 2002).

Marcadores Moleculares

A pesar de que este tipo de marcadores se basa directamente en ADN, su definición puede ser muy variable, pues se puede decir que un marcador molecular es cualquier arreglo molecular cercano a la expresión de un gen o segmentos específicos de ADN el cual es detectable y cuya herencia puede determinarse. También se le puede llamar marcador genético cuando se comporta de acuerdo con las leyes básicas de herencia mendeliana (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Villamón, 2000). No obstante, otra forma de definirlos es como moléculas que pueden relacionarse con un rasgo genético, definición en la cual también se incluyen antígenos e isoenzimas como esas biomoléculas, junto con el ADN (Claros, 1998).

Se dice que un marcador molecular es monomórfico si es invariable en todos los organismos estudiados. Si se presentan diferencias en el peso molecular, actividad enzimática, estructura o sitios de restricción, se dice que es un marcador polimórfico. En esto radica una ventaja de los marcadores moleculares basados en ADN, con los bioquímicos, pues los últimos no podían detectar suficiente polimorfismo entre variedades o especies próximas. Puesto que la expresión génica que origina las proteínas puede variar según el tipo de tejido, la etapa de desarrollo, el medio ambiente y la época del año (Claros, 1998).

En comparación con los marcadores morfológicos, los moleculares presentan un mayor nivel de polimorfismo, por lo que facilitan la elaboración de

mapas genéticos. Generalmente son neutros en relación al fenotipo, mientras que el efecto epistático sobre ellos es mínimo o nulo. En su mayoría son codominantes y contienen mayor información que los morfológicos (dominantes o recesivos en su mayoría). Los marcadores moleculares pueden utilizarse en cualquier fase del desarrollo de los organismos estudiados, por ejemplo plantas, contrario a los morfológicos, en los que se trabaja a nivel de planta adulta y completa (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Los marcadores moleculares a su vez pueden dividirse en tres grandes categorías según Claros, 1998:

RFLP (Polimorfismo en el Tamaño de los Fragmentos de Restricción):

Consiste en detectar fragmentos de ADN con diferencias en su peso molecular. Los fragmentos se obtienen a partir de digestión utilizando enzimas de restricción y el análisis se puede realizar según un patrón en la migración de las bandas apreciable en una electroforesis en geles de agarosa, esto cuando se trata de genomas como los de mitocondrias o cloroplastos. Sin embargo, para analizar el ADN cromosómico, se requiere realizar una hibridación con sondas específicas y así visualizar algunos de los fragmentos.

Esta hibridación también se puede realizar utilizando sondas específicas para secuencias minisatélites o microsátélites (Karp & Edwards, 1997).

MAAP (Múltiples Perfiles Arbitrarios de Amplificación): Este tipo de marcadores abarca aquellos basados en PCR pero que utilizan imprimadores arbitrarios de manera que no requieren mucha información previa de la secuencia investigada en el genoma. El ejemplo más representativo de este grupo son los RAPDs. Cada producto amplificado proviene de una región del genoma que contiene 2 segmentos cortos que comparten similitud con la secuencia del imprimador y que están lo suficientemente cerca para que se dé la amplificación.

A partir de esta categoría puede surgir otra en la cual se hace uso de imprimadores semiarbitrarios, ya que están basados en sitios de corte de enzimas de restricción o secuencias esparcidas a lo largo del genoma como microsátélites. A este grupo se le ha llamado AAD (ADN Arbitrariamente Amplificado) y dentro de

él se encuentran los AFLP (Amplificación de Fragmentos de Longitud Polimórfica) (Karp & Edwards, 1997).

STS (Sitios Etiquetados por la Secuencia) o SSLP (Polimorfismo de Longitud en las Secuencias Discretas): Se basan en secuencias de ADN conocidas y únicas dentro del genoma, de manera que se desarrollan imprimadores específicos que permitan amplificar las zonas flanqueantes mediante una PCR. Una vez establecidos los imprimadores, los análisis se pueden realizar en una forma más rápida en comparación con otros tipos de marcadores. Dentro de esta categoría se encuentran los microsatélites.

Microsatélites

Los microsatélites se pueden definir como un ADN ubicuo y abundante en los genomas que consiste en mono-di-tri y tetranucleótidos repetidos en tandem, de allí que también se les clasifique dentro de los VNTRs (Número Variable de Repeticiones en Tandem) (Claros, 1998). En este grupo también se encuentran los minisatélites; pero difieren en el tamaño del motivo que se repite (15-100 pb en los minisatélites y 1-4 pb en los microsatélites) y en el hecho de que los microsatélites son más polimórficos. No obstante, están presentes en los genomas de plantas y animales, siendo menos frecuentes en microorganismos (Araneda, 2004).

Los microsatélites también son conocidos como SSR (Repeticiones de Secuencias Simples), o STMS (Sitios de Microsatélite de Secuencia Etiquetada) o SSRP (Polimorfismo de Repeticiones de Secuencia Simple) (Hajeer *et al*; 2000). Estas repeticiones están flanqueadas por un único ADN y este marcador se usa como sonda en una librería genómica o de ADN copia para poder identificar los clones que lo contienen. De manera que los clones son secuenciados y se diseñan imprimadores para amplificar la zona de ADN que flanquea al microsatélite. Mediante este método es posible identificar loci simples y regiones muy variables del genoma, de manera que el polimorfismo es detectado como una diferencia de longitud en el producto amplificado, la cual puede ser incluso de 2 pares de bases (Wang *et al*; 2003). Este tipo de marcador es codominante y permite caracterizar el genotipo de los individuos (Aragonés *et al*; 2001).

La causa del grado del polimorfismo de este marcador aún no es clara, aunque se ha propuesto que se debe a un fenómeno conocido como “resbalón” o *slipagge* ocurrido durante la replicación del ADN. El cual consiste en que una cadena (ya sea la nueva o la patrón) se desliza sobre la otra en al menos un motivo, lo que provoca un mal apareamiento de las mismas (Schlotterer & Tautz, 1992; Zane *et al*; 2002; Moxon & Wills; 1999). También se cree que los polimorfismos son ocasionados por mutaciones tanto en los microsatélites en sí como en las regiones que lo flanquean. Lo cual cambia el tamaño de la región microsatélite y si se produce la duplicación de una secuencia microsatélite en otra región del genoma, se producen marcadores microsatélites multilocus (Jarne y Lagoda, 1996; Villamón, 2000).

En lo que respecta a las ventajas y al incremento del uso de microsatélites, se puede señalar que son los que proveen la más alta incidencia de polimorfismo (PIC), además, son muy informativos (herencia codominante y aún entre individuos relacionados se encuentran muchos alelos), son de uso técnicamente simple, es una técnica muy sensible pues requiere de poca cantidad de ADN (no necesariamente de alta calidad). Los datos, al ser producidos en forma confiable y muy reproducible, hacen que su uso sea analíticamente simple. Son muy abundantes en el genoma (hay uno cada 10 Kbp) y permiten un intercambio de datos sencillos entre laboratorios, ya que la información se puede comunicar por la secuencia de los imprimadores sin requerir de su transferencia física (Yáñez, 2002).

Sin embargo, el uso de microsatélites presenta ciertas limitaciones como lo son el descubrimiento complejo y el costo elevado que implica su elaboración (Araneda, 2004). Asimismo, se podrían dar problemas debido a mutaciones en el sitio de apareamiento de los imprimadores, lo cual produciría alelos nulos; también podrían darse “bandas tartamudas” las cuales son productos de PCR que difieren en una unidad de repetición con respecto a la longitud del alelo original, lo cual dificulta la interpretación de los geles, por lo que a veces estas bandas se malinterpretan como alelos, complicando esto a su vez el análisis genotípico (Chambers & McAvoy, 2000).

Usos y aportes de los marcadores moleculares en el mejoramiento de especies forestales

Los programas de mejoramiento genético en especies forestales, por lo general buscan lograr mejorar el crecimiento así como la adaptabilidad y la calidad en la madera de una determinada especie, de allí que es necesario seleccionar el mejor material genético de esa especie determinada antes de iniciar una plantación de mejoramiento. Sin embargo, la importancia de esas plantaciones, como parte de programas de mejoramiento o de conservación de germoplasma, radica en que se conozca el origen así como la composición genética del material. Puesto que la extensión y distribución de la variación genética entre especies de árboles son determinantes para su potencial evolutivo y opciones de supervivencia ante posibles cambios ambientales (Suangtho *et al*; 1999; Changtragoon, 2003).

En este punto es donde los marcadores moleculares juegan su papel. Al tener poca influencia del ambiente, mediante ellos se podrían identificar centros de poblaciones genéticamente diferenciados, al mismo tiempo que permite conocer la presencia de alelos raros o únicos en altas frecuencias dentro de una población. Estos datos pueden ser de gran utilidad para la identificación de recursos genéticos forestales que necesitan ser conservados. Una vez que los marcadores moleculares hayan permitido establecer la diversidad genética entre y dentro de las poblaciones, se aconseja elegir las poblaciones genéticamente más diversas y que presenten tasas relativamente altas de polinización cruzada (en especies donde esto se presenta) como fuente para los programas de conservación (Changtragoon, 2003).

A manera de ejemplo, en Tailandia se han estudiado 15 poblaciones en estado natural de *T. grandis* mediante el uso de RAPD's y a partir de los datos obtenidos se determinó un alto grado de polinización cruzada (82-97 %). Del total de la variación, un 21 % se le atribuyó a diferencias entre poblaciones (Changtragoon & Szmidt, 2000). Entonces, se puede afirmar que para facilitar la conservación genética, los marcadores moleculares se pueden utilizar de dos maneras. Una sería para evaluar el estado genético de las plantaciones *ex situ* y en los lugares donde se da conservación *in situ*, según las prácticas convencionales de silvicultura. Mediante marcadores se podría verificar si se

tienen los clones y rametos identificados adecuadamente, si la diversidad genética es representativa del pool genético de la especie, de manera que se puedan establecer medidas correctivas (Changtragoon, 2003).

Los marcadores moleculares son útiles para evaluar el estado de los recursos genéticos de especies en las cuales aún no se han establecido programas de mejoramiento o conservación. Permiten determinar el sistema de apareamiento, la variación dentro y entre poblaciones (ejemplificada anteriormente), así como el flujo de genes. De esta forma, pueden indicar cómo y dónde coleccionar muestras para la conservación *ex situ* e identificar sitios apropiados para la conservación *in situ*. Igualmente, se pueden usar marcadores moleculares para medir parámetros, como el tamaño adecuado de una población para su conservación y estudiar acontecimientos como cuellos de botella, así como inferir las relaciones geográficas e históricas entre diversos grupos de poblaciones, el movimiento del polen y la dispersión de semillas en especies forestales (Changtragoon, 2003).

Los resultados obtenidos pueden determinar parámetros como el muestreo de las poblaciones, el diseño y manejos de huertos semilleros, sin dejar de lado el control de métodos de polinización (Changtragoon, 2003). También permitirían evaluar la estructura genética de ensayos de progenie, los cuales pretenden valorar genéticamente a individuos seleccionados e incluidos en un programa de mejoramiento forestal basándose en sus descendientes (Rojas, 1999). Sin embargo, muchas veces se requiere que haya respaldo por parte de otros tipos de estudios ecogeográficos, así como de las mediciones de caracteres adaptativos, para lograr programas de mejoramiento y conservación exitosos (Changtragoon, 2003).

Actualmente el uso de marcadores moleculares permite la identificación y discriminación de individuos (se determina su huella genética o *Fingerprint*), lo cual es de gran importancia para establecer controles de cruzamiento, estudios de diversidad y distancia genética, así como en la identificación y protección de material patentado. Por lo tanto, es importante señalar que en Costa Rica se han utilizado marcadores moleculares para analizar la colección de clones de *T. grandis* del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Con diez loci se ha podido generar una huella genética de cada uno de los clones, lo cual permitió

determinar que algunos individuos pertenecían a un mismo clon, a pesar de que estaban etiquetados como clones diferentes en el jardín clonal. Lo anterior evidencia el hecho de que se podría crear un registro genético para cada clon como parte de un mecanismo de seguridad si se sospecha que terceros han robado material de esos clones. Pues esta técnica de “huella digital” se usa para comprobación de identificación clonal y de contaminación de los jardines clonales (Araya *et al*; 2005a).

Al utilizar esos 10 microsatélites se ha podido determinar la relación genética de clones de *T. grandis* del ITCR. De manera que se determinó que algunos clones compartían con otros hasta un 90-95% de sus componentes genéticos mientras que otros sólo un 20% de sus elementos genéticos (Araya *et al*; 2005a).

En el caso de *T. grandis* también se han usado otros marcadores genéticos en diferentes estudios, lo que ha permitido determinar la diversidad genética en poblaciones de distintas procedencias por medio de la variación en isoenzimas (Kertadikara & Prat, 1995). Por otro lado, también se ha evaluado la diversidad de alozimas y la distancia genética entre dos “razas locales” de Nicaragua y Tanzania (Kjær & Siegismund 1996). Sin embargo, son los marcadores moleculares como RAPD's, los que se han utilizado para implementar un manejo más confiable de los clones de árboles plus de teca (Araya *et al*, 2005b; Watanabe *et al*, 2004).

No obstante, puede surgir la incertidumbre de cuál marcador utilizar en determinado estudio, por lo tanto es necesario considerar aspectos que van desde el puramente económico, como lo son el costo de su desarrollo así como el costo por ensayo, hasta los técnicos porque en algunos se puede requerir de marcaje radiactivo (y por ende se necesita un manejo adecuado de desechos), también hay que considerar el nivel de habilidad requerido por parte del investigador y la posibilidad de automatización. Esto sin dejar de lado el nivel de confiabilidad y certeza que ofrece el tipo de marcador (Karp & Edwards, 1997).

En referencia a lo anterior, es importante destacar que los microsatélites presentan un costo económico por ensayo menor respecto a los RFLP y AFLP, además, si ya hay imprimadores disponibles, no hay costo de desarrollarlos, pues un laboratorio podría simplemente adquirirlos. Sin embargo, la habilidad requerida

es un poco mayor, pero los microsatélites son mucho más polimórficos e informativos, pues al ser codominantes permiten establecer con más certeza el genotipo de los individuos (contrario a los RAPD que son dominantes) así como inferir con más precisión las relaciones filogenéticas dentro o entre poblaciones de especies forestales, por lo que los microsatélites consisten una de las mejores opciones para este tipo de estudios (Karp & Edwards, 1997).

Pero al fin y al cabo la cuestión de cuál marcador usar depende del objetivo de las investigaciones y de qué tan claras o precisas deban ser las respuestas o conclusiones obtenidas a partir de esos estudios así como de con qué recursos se cuenta.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Analizar las relaciones genéticas de la población de mejoramiento de *T.grandis* del Centro Agrícola Cantonal de Hojancha (CACH).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer el tamaño y frecuencia de los alelos presentes en las diferentes familias.
- Definir la huella genética de los individuos de cada familia.
- Determinar la diversidad genética dentro de las familias analizadas de la población.
- Determinar el grado de parentesco genético dentro de las familias de la población.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en los laboratorios de Biología Molecular del Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, y en el Laboratorio de Ecología-Genética de la Universidad de Costa Rica, en San Pedro de Montes de Oca, San José.

Obtención y manejo del material vegetal

El material fue colectado en la finca del señor Jorge León, en el asentamiento del Instituto de Desarrollo Agrario (IDA), Oricuajo, Labrador de San Mateo, Alajuela. Este sitio forma parte de una serie de ensayos de progenies establecidos en 1999 dentro del marco del Programa de Mejoramiento Genético del Centro Agrícola Cantonal de Hojancha (CACH).

Para establecer el ensayo se colectaron semillas de 28 familias (árboles plus o madre) y fueron sembrados utilizando un diseño de bloques completos al azar. De manera que cada sitio de evaluación consta de 6 repeticiones (6 bloques) y dentro de cada bloque se encuentran 6 progenies por tratamiento o familia distribuidas aleatoriamente en 3 parejas. Sin embargo, el sitio de investigación cuenta con 27 familias.

Para realizar el análisis se colectaron hojas de 3 árboles por familia, para un total de 81 muestras. Las muestras se tomaron utilizando una podadora de extensión, se empacaron en bolsas plásticas rotuladas según un código que indica el número de familia y el número de individuo (1.1, 1.2, 1.3, 2.1 etc). En el apéndice 1 se muestra la ubicación de cada uno de los árboles muestreados en el ensayo así como su código. Éstas muestras se transportaron en una hielera y se conservaron a -20 °C en el laboratorio hasta su procesamiento.

Extracción de ADN a partir de hojas de *T. grandis*

El protocolo de extracción utilizado basado en CTAB, fue reportado por Lodhi *et al* (1994), con algunas modificaciones realizadas por Araya *et al* (2005b). En esta investigación se incluyeron otras modificaciones.

El tejido de cada uno de los individuos fue macerado utilizando nitrógeno líquido, según lo recomendado por Araya *et al* (2005b). En un tubo de 1,5 mL se colocaron 100 mg del tejido macerado. Se agregaron 250 µL del amortiguador de extracción (Tris HCl 100 mM pH 8,0; NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, CTAB 2%, PVP 2%, Mercaptoetanol 0,2%) y se volvió a macerar. Luego se agregaron otros 500 µL del mismo amortiguador y se incubó a 65 °C por 25 minutos en un baño maría.

Una vez que finalizó la incubación, se enfriaron los tubos hasta alcanzar temperatura ambiente. Se añadieron 750 µL de cloroformo- octanol (24:1) y se mezcló invirtiendo el tubo 20 veces. Se centrifugó a 6000 rpm durante 15 minutos

en una centrifuga Eppendorf modelo 5415-D. Se extrajo aproximadamente 400 μL del sobrenadante y se colocaron en un microtubo nuevo. El lavado con cloroformo- octanol se realizó 2 veces.

Al sobrenadante recuperado se le agregó 0.5 volúmenes de agua destilada estéril, 1.5 volúmenes de NaCl 5M y 0.6 volúmenes de Isopropanol frío. Se mezcló nuevamente por inversión y se incubó a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante una hora. Posteriormente se centrifugó a 10 000 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante tratando de evitar el desprendimiento del botón. Se realizó un lavado con 750 μL de etanol al 70 %, y una vez descartado éste, se colocaron los tubos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una estufa marca LAB-LINE modelo CK219364 por una hora. Finalmente las muestras fueron resuspendidas en 75 μL del amortiguador TE (10 mM Tris HCl pH 8,0; 1mM EDTA) y se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Se aplicó un tratamiento con ARNasa el cual consistió en agregar 2.5 μL de ARNasa A (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) marca Sigma por cada 100 μL de ADN e incubar durante 1 hora a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Con el fin de visualizar el ADN extraído, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1 %. Dicho gel fue teñido con 2 μL de bromuro de etidio (10 mg/mL). Se utilizó la cámara modelo MGU-502T de CBS. Scientific Co con capacidad de 100 mL. La electroforesis se realizó durante 45 minutos a 75 V, utilizando el amortiguador TAE 1X y la fuente de poder modelo EPS 301 de Amersham Pharmacia Biotech. El ADN fue visualizado en un transiluminador de luz ultravioleta modelo MacroVue UV20 de UV HOEFER.

En los casos donde se tuvieron que repetir extracciones a partir de una misma muestra, se unieron en un solo tubo de 1,5 mL. Luego se determinó el volumen final y se agregó 2 volúmenes de etanol absoluto frío, posteriormente se dejó precipitando el ADN durante 30 minutos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Después se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos, se descartó el etanol absoluto y se agregaron 750 μL de etanol al 70 %. Se descartó el etanol al 70 % y se dejó secando los precipitados de ADN a 37°C por 1 hora, finalmente, se resuspendió el ADN en 100 μL de amortiguador TE.

La cuantificación del ADN se realizó en el espectrofotómetro Genesys 10 UV (Thermo Spectronic). Las mediciones de absorbancia se realizaron a partir de una dilución 1:100 de las muestras de ADN (10 μL de muestra: 990 μL de agua

destilada estéril) a 260 nm. Además utilizando el cuantificador ADN/ARN GENEQUANT modelo 802103-98 (Farmacia Biotech) se determinó la absorbancia a 280 nm, 320 nm y 230 nm; así como la relación entre la absorbancia a 260 y a 280 nm, porcentaje de pureza y concentración de proteínas (mg/mL).

La concentración de ADN se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$[\text{ADN}] \mu\text{g}/\mu\text{L}: \text{Absorbancia a } 260 \text{ nm} \times 50 (\mu\text{g}/\text{mL}) \times \text{Factor de dilución (100)}.$$

Con base en los datos de cuantificación se realizaron diluciones de las muestras de ADN en agua bidestilada estéril, de manera que todas las muestras diluidas tuvieran la misma concentración de ADN (la menor según los datos de la cuantificación), esto para darle uniformidad a las muestras.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para microsatélites en *T.grandis*.

La mezcla de PCR utilizada se señala en el cuadro 1. Fue tomada de la establecida por Schuelke (2000), pero con las siguientes modificaciones: uso del Buffer 10X PCR-Fermentas $\text{NH}_4(\text{SO}_4)$, uso de Albúmina de Suero Bóvino (BSA) 10 mg/mL, no se utilizó M13 10 y la cantidad de ADN fue de 40 ng.

Cuadro 1. Mezcla de PCR utilizada en microsatélites de *T.grandis*.

| Componente | 1 Reacción (μL) |
|---|------------------------|
| Buffer 10X PCR-Fermentas $\text{NH}_4(\text{SO}_4)$ | 2 |
| MgCl ₂ 25 mM | 1,6 |
| BSA 10 mg/mL | 0,4 |
| dNTPs 2.5 mM | 1,6 |
| Forward primer 7.27 μM | 2 |
| Reverse primer 4 μM | 2 |
| Taq polimerasa 5 U/ μL | 0,2 |
| ADN 5 ng/ μL | 8 |
| Agua | 2,2 |
| Volumen Total | 20 |

Fuente: Tomado y adaptado de Schuelke (2000).

Todas las reacciones de PCR se realizaron según el perfil térmico especificado en el cuadro 2 y se utilizaron 7 pares de imprimadores (Cuadro 3).

Cuadro 2. Perfil térmico o condiciones de PCR para la amplificación de microsatélites en *T.grandis*.

| Programa | Paso | Temperatura (°C) | Tiempo | Ciclos |
|----------|---------------------------|------------------|--------|--------|
| 1 | Desnaturalización inicial | 94 | 5' | 1 |
| 2 | Desnaturalización | 94 | 30'' | 32 |
| | Apareamiento | * | 45 '' | |
| | Extensión | 72 | 45'' | |
| 3 | Extensión final | 72 | 10' | 1 |
| 4 | Almacenamiento | 4 | ∞ | - |

Fuente: Tomado y adaptado de Schuelke (2000).

*La temperatura de apareamiento es específica para cada imprimador.

Cuadro 3. Imprimadores utilizados para amplificar las secuencias simples repetidas (SSR) de *T.grandis*.

| Locus | Imprimador que copia hacia adelante | Imprimador que copia hacia atrás | Temperatura de apareamiento (°C) | Referencia en banco de genes |
|-----------|-------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|------------------------------|
| TG-AC01 | CATGTTGTATCATGAAT GTG | CCTAGAAGAGAACCCCAT GC | 55 | AJ511746 |
| TG-AC44 | ACGCGGGTGTTAGGAAA ATG | CCCATCAAACCTGAGACAAC CA | | AJ515256 |
| TG-AG14 | TCCACGACTCATGCAGG CTA | CCAACCAACCCTTTCAAAT CC | 56.2 | AJ539417 |
| TG-CPI-MS | TTTCCCGTTATGTAGAG AATTGA | CCCAAATTGTGAACGATGA A | 55.2 | |
| TG-ATC02 | TCAAAGCTTGGCTACCA CCA | GCCGAATTGGGACGACTT TA | | |
| TG-AG16 | ATGCAAAAACGGAGTCT TGG | GGCAGAGCTATCTGAAGA TCC | 55.1 | AJ539419 |
| TG-ADH-MS | TGCTATTTTCGGACTTG GAG | ACCAGCCAATCTAGCTCCT T | | |

Fuente: Volkaert, 2002.

Una reacción de PCR de prueba fue realizada en el termociclador MyCycler de Bio-Rad utilizando el imprimador TG-AC01 y ADN de 7 muestras. Luego se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 2 % utilizando el amortiguador TBE 1X a 75 V durante 2 horas. Las reacciones de PCR para todas las muestras con cada uno de los imprimadores se efectuaron en el termociclador MJ Research, Inc modelo PTC-200 (Peltier Termal Cycler), con excepción de los imprimadores TG-AC01 y TG-AC44 cuyos PCRs se realizaron en el termociclador MyCycler de Bio-Rad.

Una vez completadas todas las PCR's se tomó una muestra aleatoria de productos de cada uno de los imprimadores y se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,6 % durante 2 horas a 75 V con amortiguador TBE 1X, utilizando el mismo equipo especificado anteriormente.

Visualización de los productos de PCR en geles de poliacrilamida

Los productos de PCR fueron visualizados en geles de poliacrilamida (solución de acrilamida al 5%, 200 µL de TEMED y 100 µL de persulfato de amonio al 25 %). Se utilizó la cámara de electroforesis vertical Sequi-Gen® de Bio-Rad con capacidad para 49 muestras y la fuente de poder marca Termo EC, modelo Enhamed EM. Se agregó 5 µL del amortiguador de carga (compuesto por sacarosa, azul de bromofenol, azul de xilencianol y formamida), a cada uno de los tubos con producto de PCR que contenían un volumen de 20 µL. Se utilizó el termociclador FGEN02TD de Genius TECHNE para desnaturalizar tanto los marcadores GeneRuler™ 1000 bp DNA Ladder Plus (Fermentas™) y Mass Ruler MS0403 (Fermentas™) como las muestras. La desnaturalización se realizó a 95 °C durante 5 minutos. Luego de la desnaturalización, las muestras se colocaron inmediatamente en hielo y se mantuvieron sobre éste por 5 minutos.

Antes de cargar las muestras, el gel fue precalentado hasta que llegara a una temperatura de 50 °C o por 3 horas. La electroforesis fue realizada durante 3 horas a 75 Watts constantes, utilizando el amortiguador TBE 1X. La visualización de las bandas se hizo mediante tinción con plata (Valadez & Kahl, 2000).

Análisis de datos de los microsatélites

Tamaño de los alelos.

Se determinó el peso molecular de cada uno de los alelos observados haciendo un análisis de regresión entre el peso molecular de las bandas del marcador y su distancia de migración en la electroforesis, en milímetros. Se obtuvo una ecuación con la cual fue posible calcular el peso molecular de cada uno de los alelos identificados. Posteriormente se asignó un número a cada alelo, según su distancia de migración, con el objetivo de establecer el genotipo para los individuos.

Determinación de las frecuencias alélicas.

Luego de determinar el genotipo de cada individuo por medio del número asignado a los diferentes alelos encontrados, se calculó la frecuencia de cada alelo. Para ello, se contaron las veces en que cada alelo se repetía en el locus y se dividió esa cifra entre el número total de alelos de los individuos que presentaron datos completos.

Determinación de la huella genética (Fingerprint).

Con base en la cantidad y tamaño de alelos en cada locus se generó una huella genética para cada individuo. De los 7 imprimadores que se tenían inicialmente, se logró obtener datos con 3 de ellos.

Se debe aclarar que no todos los individuos de cada familia presentaron amplificación con los 3 imprimadores analizados. Por tanto la huella genética y los análisis de diversidad y distancia genética, se realizaron sólo para los individuos que mostraron amplificación para los 3 loci.

Diversidad y distancias genéticas

Diversidad genética.

La estructura genética se determinó utilizando el programa Microsoft Excel, con base en la siguiente fórmula (Gregorius, 1978):

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

Se procedió además a calcular el Contenido de Información Polimórfica (PIC) para conocer que tan informativos son los loci analizados, mediante la siguiente fórmula:

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

Distancia genética (parentesco).

Se determinó el número de alelos que comparten los individuos, de manera que luego se trasladan los valores a un porcentaje que define la distancia genética entre los individuos

Análisis estadísticos

Se realizó un análisis de escalamiento multidimensional (MDS por sus siglas en inglés) el cual se basó en los resultados de distancia genética para los individuos analizados.

RESULTADOS

Extracción de ADN a partir de hojas de *T. grandis*

Para determinar la calidad del ADN se procedió a realizar varias electroforesis en geles de agarosa. En muchas de las muestras se observaron bandas muy tenues con barrido, por lo que se procedió a utilizar nitrógeno líquido en la maceración del tejido, dando como resultado la visualización de bandas de ADN en forma menos intensa; pero con poca o nula presencia de barridos. Los resultados anteriores se pueden observar en la figura 1.

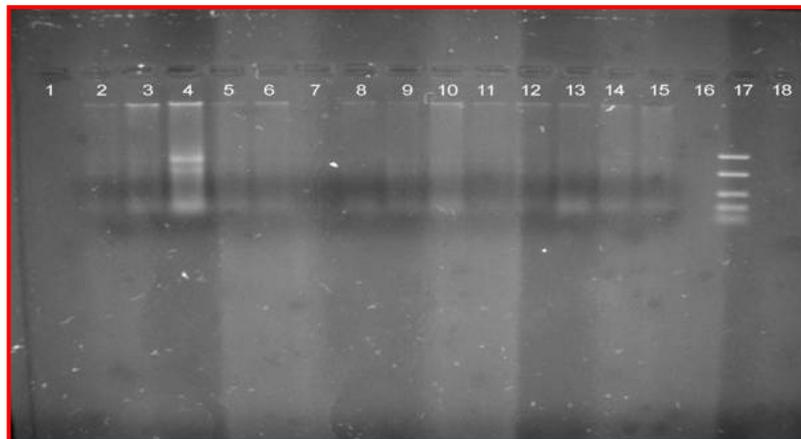


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ADN total de los individuos 7.2, 7.3, 8.1, 8.2, 8.3, 9.1, 9.2, 9.3, 10.1, 10.2, 10.3, 11.1, 11.2, 11.3 de *T. grandis*.

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica, 2006.

En la figura 1 se puede apreciar la presencia de bandas definidas de alto peso molecular cerca de los pozos donde se cargaron las muestras (los carriles 1, 16 y 18 no fueron cargados). También se puede observar que no hay mucho barrido, a pesar de que las muestras todavía no habían sido tratadas con ARNasa. El pozo número 17 fue cargado con el marcador de peso molecular Fast Ruler Low Range (FermentasTM).

Al haber muestras que presentaban alto grado de degradación sin bandas bien definidas de ADN (no se evidenció en la figura 1), se procedió a repetir las extracciones de esas muestras.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para microsatélites en *T.grandis*

Respecto a la cuantificación de ADN (Apéndice 2), la menor concentración fue de 5 ng/ μ L. Por tanto todas las muestras se diluyeron para que tuvieran 5 ng/ μ L como concentración final. Como resultado de la reacción de PCR que se realizó de prueba con 7 muestras diluidas y el imprimador TG-AC01, se puede observar en la figura 2 que sí se dio amplificación utilizando muestras de ADN a una concentración de 5 ng/ μ L. Además, en el pozo correspondiente al control (agua estéril en lugar de ADN) no se observó amplificación.

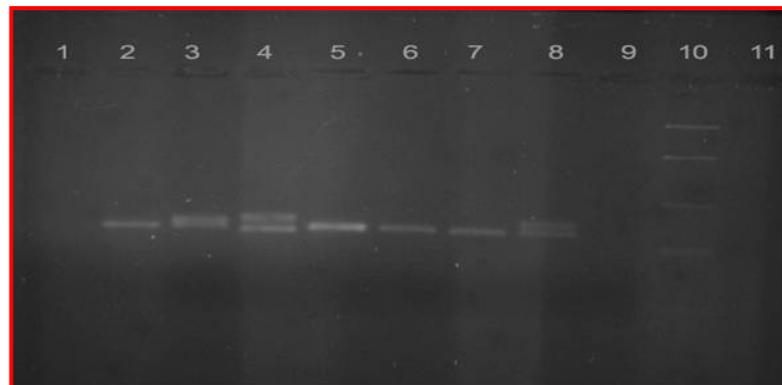


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % con productos de PCR utilizando el imprimador TG-AC01. **1)** Vacío **2)** 19.3. **3)** 23.1. **4)** 10.1. **5)** 15.2. **6)** 28.1. **7)** 8.3. **8)** 2.1. **9)** Control negativo. **10)** Marcador de peso molecular. **11)** Vacío.

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica, 2006

Luego de esa prueba preliminar, se puede apreciar en la figura 3 que hubo amplificación cuando se evaluaron todos los imprimadores con un lote de muestras aleatorias. Mediante comparación en la migración de bandas con el marcador de peso molecular, Fast Ruler Low Range (FermentasTM), se determinó que el tamaño molecular en pares de bases (bp) de los productos de PCR obtenidos es de aproximadamente 200 bp.

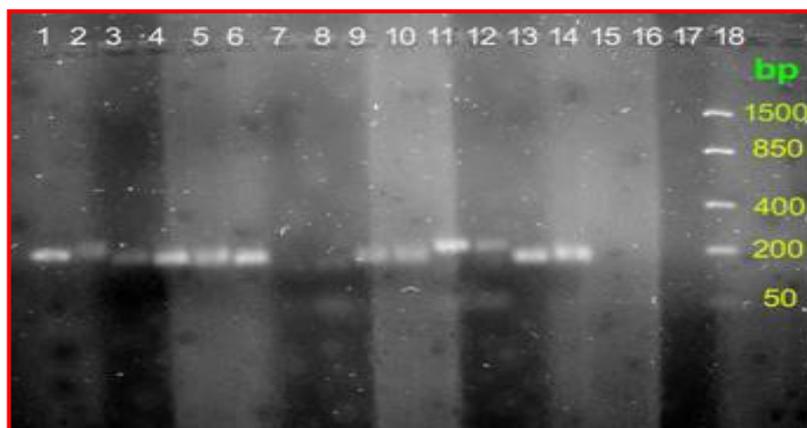


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1.6 % con productos de PCR de los 7 imprimadores analizados para *T. grandis*. **1- 2:** TG-AC01. **3-4:** TG-AC44. **5-6:** TG-AG14. **7-8:** TG-AG16. **9- 10:** TG-ADH-MS. **11-12:** TG-ATC02. **13-14:** TG-CPI-MS. **15 y 17:** Vacíos. **16:** Control negativo. **18:** Marcador de peso molecular.

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica, 2006.

En los productos correspondientes a los imprimadores TG-AG16 y TG-ATC02 se aprecia una banda de 50 bp. No obstante, con el imprimador TG-AG16, las bandas correspondientes a los productos de amplificación esperados no se vieron con mucha intensidad en el transiluminador. El control utilizado corresponde al del imprimador TG-CPI-MS y como se aprecia en la figura 3, no presentó amplificación.

Visualización de los productos de PCR en geles de poliacrilamida

Por medio de la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida y por tinción a base de nitrato de plata se pudieron visualizar productos de PCR. De los 14 geles que se corrieron, sin embargo, sólo en 6 de ellos se pudieron apreciar alelos en forma clara. Esos geles corresponden a los imprimadores TG-AC01, TG-AG16 y TG-ATC02, los cuales se pueden apreciar en la figura 4.

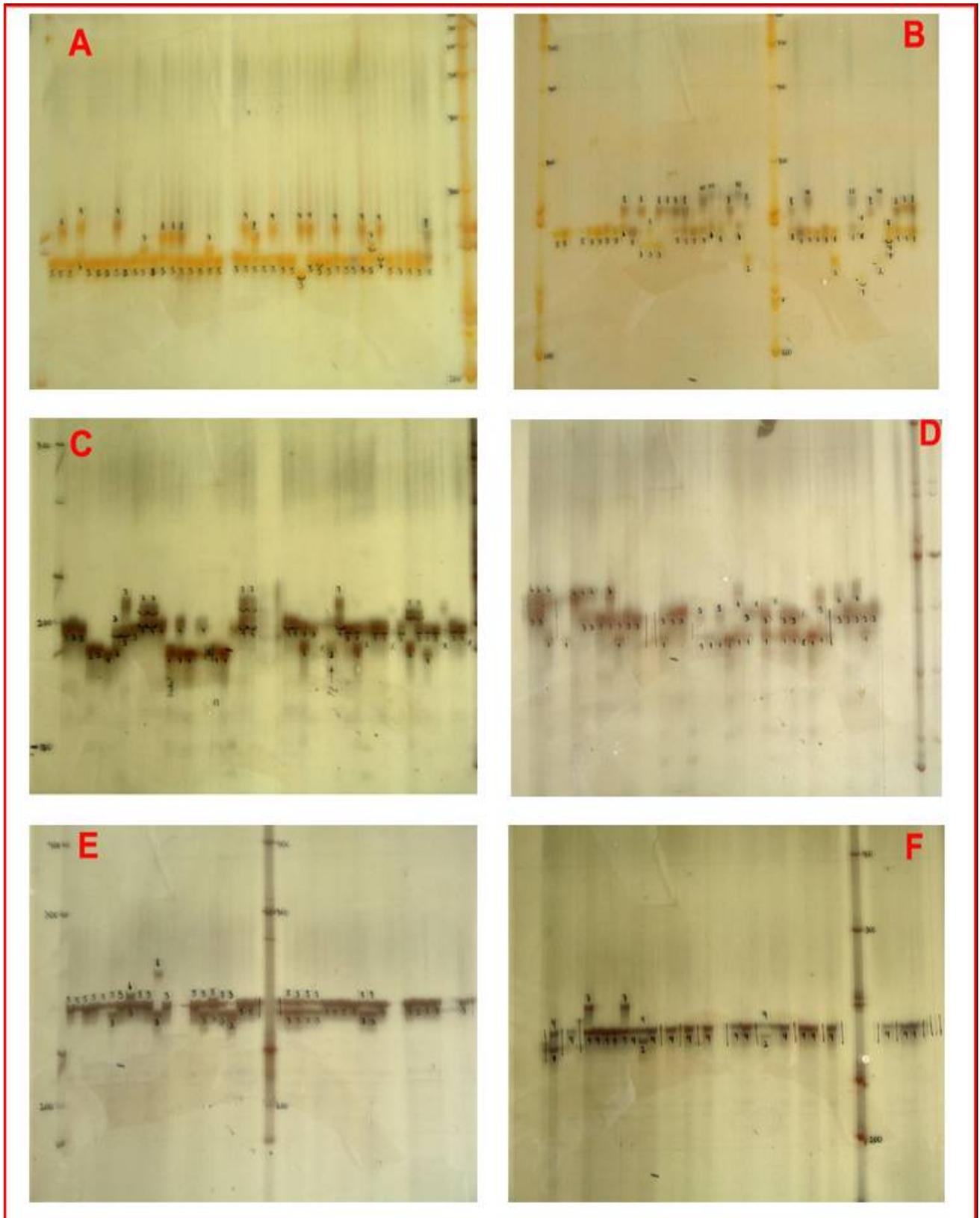


Figura 4. Visualización de productos de PCR utilizando 3 pares de imprimadores de microsatélites en *T.grandis*. **A-B:** TG-AC01. **C-D:** TG-AG16. **E-F:**TG-ATC02. Los gels A, C y E corresponden a las primeras 14 familias mientras que B, D y F abarcan las restantes 13 familias.

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica, 2006.

Análisis de datos de los microsatélites

Tamaño y frecuencia de los alelos

Con base en los 6 geles con los que se obtuvieron resultados completos, se le asignó un número a cada alelo a partir del que más migró durante la electroforesis. El número de alelos en cada locus así como su tamaño, en pares de bases (bp) se presenta en el cuadro 4. Con el par de imprimadores TG-AC01 se visualizó el mayor número de alelos (10 en total) así como el mayor promedio del tamaño de los alelos mientras que con el imprimador TG-AG16 sólo 7, y con el menor tamaño de los alelos, en promedio. En promedio el número de alelos por locus fue de 8,33.

Cuadro 4. Número y tamaño de los alelos identificados para 3 loci en un ensayo de progenie de *T.grandis*.

| IMPRIMADOR TG-AC01 | | IMPRIMADOR TG-AG16 | | IMPRIMADOR TG- ATC02 | |
|----------------------|--------------|--------------------|--------------|----------------------|--------------|
| Alelo | Tamaño (bp) | Alelo | Tamaño (bp) | Alelo | Tamaño (bp) |
| 1 | 209 | 1 | 163 | 1 | 213 |
| 2 | 217 | 2 | 165 | 2 | 217 |
| 3 | 228 | 3 | 172,5 | 3 | 221 |
| 4 | 233 | 4 | 175 | 4 | 223 |
| 5 | 236,5 | 5 | 179,5 | 5 | 226 |
| 6 | 241,5 | 6 | 182 | 6 | 231 |
| 7 | 247 | 7 | 184 | 7 | 239 |
| 8 | 253,5 | - | - | 8 | 248 |
| 9 | 261 | - | - | - | - |
| 10 | 268 | - | - | - | - |
| Promedio | 239,5 | - | 174,4 | | 227,3 |
| R² | 0,991 | | 0,992 | | 0,992 |

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica, 2006.

Determinación de la huella genética (Fingerprint)

Se determinó la huella genética o “Fingerprint” de 51 individuos de *T.grandis* usando 3 pares de imprimadores (Cuadro 5). La letra corresponde al locus seguida del número del alelo.

Cuadro 5. Huella genética de 51 individuos de *T. grandis* obtenidas a partir del análisis con 3 microsatélites.

| Individuo | Imprimador y Locus | | | | | |
|-----------|----------------------|-----|----------------------|----|-----------------------|----|
| | TG-AC01 (Locus A) | | TG-AG16 (Locus B) | | TG-ATC02 (Locus C) | |
| 1.1 | A5 | A5 | B3 | B3 | C5 | C5 |
| 1.2 | A5 | A8 | B3 | B3 | C5 | C5 |
| 1.3 | A5 | A5 | B3 | B3 | C5 | C5 |
| 2.1 | A6 | A9 | B2 | B2 | C5 | C5 |
| 2.2 | A5 | A5 | B2 | B2 | C5 | C5 |
| 2.3 | A5 | A5 | B1 | B1 | C3 | C5 |
| 3.1 | A5 | A5 | B2 | B3 | C5 | C5 |
| 3.2 | A5 | A9 | B3 | B7 | C5 | C6 |
| 3.3 | A5 | A5 | B3 | B3 | C5 | C5 |
| 4.1 | A5 | A5 | B4 | B7 | C5 | C5 |
| 4.2 | A5 | A7 | B4 | B7 | C3 | C8 |
| 4.3 | A5 | A5 | B4 | B4 | C5 | C5 |
| 5.3 | A8 | A5 | B1 | B1 | C5 | C5 |
| 6.1 | A5 | A5 | B4 | B4 | C3 | C5 |
| 6.2 | A5 | A5 | B1 | B1 | C3 | C5 |
| 6.3 | A5 | A7 | B1 | B1 | C3 | C5 |
| 7.3 | A5 | A5 | B4 | B7 | C5 | C5 |
| 8.1 | A9 | A5 | B4 | B4 | C3 | C5 |
| 8.2 | A8 | A5 | B2 | B3 | C3 | C5 |
| 8.3 | A5 | A5 | B3 | B3 | C3 | C5 |
| 9.2 | A5 | A5 | B2 | B2 | C5 | C5 |
| 9.3 | A5 | A5 | B4 | B7 | C5 | C5 |
| 10.1 | A3 | A9 | B3 | B3 | C5 | C5 |
| 10.2 | A5 | A9 | B2 | B3 | C5 | C5 |
| 11.1 | A5 | A5 | B3 | B3 | C3 | C5 |
| 11.2 | A5 | A9 | B3 | B3 | C5 | C5 |
| 12.2 | A5 | A9 | B2 | B5 | C5 | C5 |
| 12.3 | A5 | A7 | B3 | B5 | C5 | C5 |
| 13.1 | A6 | A9 | B1 | B3 | C5 | C5 |
| 13.2 | A5 | A5 | B3 | B3 | C5 | C5 |
| 14.2 | A5 | A5 | B3 | B3 | C5 | C5 |
| 15.2 | A5 | A5 | B3 | B6 | C1 | C4 |
| 19.3 | A5 | A5 | B6 | B6 | C4 | C7 |
| 20.1 | A5 | A5 | B3 | B6 | C4 | C4 |
| 20.2 | A5 | A5 | B3 | B6 | C4 | C4 |
| 20.3 | A6 | A8 | B3 | B3 | C4 | C4 |
| 21.1 | A5 | A5 | B3 | B6 | C4 | C7 |
| 21.2 | A3 | A8 | B1 | B3 | C4 | C4 |
| 21.3 | A3 | A5 | B3 | B3 | C2 | C4 |
| 22.1 | A3 | A8 | B3 | B3 | C4 | C4 |
| 23.2 | A5 | A5 | B3 | B3 | C4 | C4 |
| 25.1 | A6 | A10 | B1 | B5 | C4 | C4 |
| 25.2 | A2 | A8 | B1 | B1 | C4 | C4 |
| 27.1 | A5 | A8 | B1 | B3 | C2 | C4 |
| 27.3 | A5 | A10 | B1 | B3 | C4 | C4 |
| 28.2 | A5 | A5 | B1 | B3 | C4 | C4 |
| 28.3 | A2 | A5 | B1 | B3 | C4 | C4 |
| 29.2 | A5 | A10 | B1 | B1 | C4 | C4 |
| 33.2 | A2 | A10 | B3 | B6 | C4 | C4 |
| 35.1 | A5 | A8 | B3 | B6 | C4 | C4 |
| 35.2 | A5 | A8 | B1 | B3 | C4 | C4 |

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica, 2006.

Los genotipos señalados con diferentes colores en el cuadro 6 son los que presentan los alelos con menores frecuencias en cada locus. Para el caso del locus A, son los alelos 1 y 4, ambos con una frecuencia de 0,0 (no están presentes en ninguno de los 51 individuos incluidos en el análisis) mientras que en el locus B son los alelos 5 y 7 (frecuencias de 0,029 y 0,049 respectivamente) presentes en 8 individuos y para el locus C son los alelos 1, 6 y 8 encontrados en 3 individuos (frecuencia de 0,01).

Diversidad genética

Una vez que se determinaron los alelos y el genotipo de los 51 individuos que presentaron resultados completos. Se estableció la frecuencia de cada alelo, la diversidad genética y el Contenido de Información Polimórfica (PIC) de cada locus, los cuales se presentan en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Frecuencias alélicas, diversidad genética y contenido de información polimórfica obtenidos con 3 pares de microsatélites en *T. grandis*.

| Microsatélite (Locus) | Alelo | Frecuencia | Diversidad genética (Gregorius,1978) | Contenido de Información Polimórfica (PIC) |
|---------------------------|-------|------------|--------------------------------------|--|
| TG-AC01 (Locus A) | 1 | 0,000 | 2,3 | 0,56 |
| | 2 | 0,029 | | |
| | 3 | 0,039 | | |
| | 4 | 0,000 | | |
| | 5 | 0,647 | | |
| | 6 | 0,039 | | |
| | 7 | 0,029 | | |
| | 8 | 0,098 | | |
| | 9 | 0,078 | | |
| | 10 | 0,039 | | |
| TG-AG16 (Locus B) | 1 | 0,196 | 3,7 | 0,73 |
| | 2 | 0,098 | | |
| | 3 | 0,451 | | |
| | 4 | 0,098 | | |
| | 5 | 0,029 | | |
| | 6 | 0,078 | | |
| | 7 | 0,049 | | |
| TG-ATC02 (Locus C) | 1 | 0,010 | 2,7 | 0,62 |
| | 2 | 0,020 | | |
| | 3 | 0,088 | | |
| | 4 | 0,343 | | |
| | 5 | 0,500 | | |
| | 6 | 0,010 | | |
| | 7 | 0,020 | | |
| | 8 | 0,010 | | |
| Promedio | - | - | 2,9 | 0,64 |

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica, 2006.

En el cuadro 6 se aprecia que a pesar de que el locus A presenta la mayor cantidad de alelos, éste mismo locus tiene los valores más bajos de diversidad genética y de PIC, mientras que estos valores para el locus B son los más altos.

El PIC promedio fue de 0,64, y la diversidad genética tuvo un valor promedio de 2,9.

Distancia genética (parentesco).

A partir de los resultados de distancia genética, se hizo una matriz para mostrarlos (Cuadro 7). Esta matriz indica cual es el nivel de parentesco entre los individuos y también incluye el dato de cuánto es la distancia genética de cada individuo en relación al resto del grupo, según el promedio establecido en la parte inferior del cuadro, de manera que el individuo 25.1 es el que presenta un menor parentesco respecto al resto del grupo con un valor de 0,82.

Análisis estadístico.

Con base en los datos de la matriz de distancia genética y de la huella genética, fue posible realizar una representación gráfica del nivel de parentesco mediante un análisis MDS. En la figura 5 se puede apreciar que hay dos grandes grupos, uno a cada lado del eje central y que varios individuos se superponen en un mismo punto de la imagen.

Cuadro 7. Matriz de distancia genética obtenida en un ensayo de progenie de *T. grandis* con 3 microsatélites.

| | 11 | 12 | 13 | 21 | 22 | 23 | 31 | 32 | 33 | 41 | 42 | 43 | 53 | 61 | 62 | 73 | 73 | 81 | 82 | 83 | 92 | 93 | 101 | 102 | 111 | 112 | 122 | 123 | 131 | 132 | 142 | 152 | 193 | 201 | 202 | 203 | 211 | 212 | 213 | 221 | 232 | 251 | 252 | 271 | 273 | 282 | 283 | 292 | 332 | 351 | 352 | |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1.1 | 0.00 | 0.17 | 0.00 | 0.67 | 0.33 | 0.50 | 0.17 | 0.50 | 0.00 | 0.33 | 0.83 | 0.33 | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.67 | 0.33 | 0.67 | 0.50 | 0.17 | 0.33 | 0.33 | 0.33 | 0.33 | 0.17 | 0.17 | 0.50 | 0.33 | 0.50 | 0.00 | 0.00 | 0.50 | 0.67 | 0.50 | 0.50 | 0.67 | 0.50 | 0.83 | 0.50 | 0.67 | 0.33 | 1.00 | 1.00 | 0.67 | 0.67 | 0.50 | 0.67 | 0.83 | 0.83 | 0.67 | 0.67 | |
| 1.2 | 0.17 | 0.00 | 0.17 | 0.67 | 0.50 | 0.67 | 0.33 | 0.50 | 0.17 | 0.50 | 0.83 | 0.50 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.50 | 0.83 | 0.67 | 0.33 | 0.50 | 0.33 | 0.33 | 0.33 | 0.33 | 0.17 | 0.17 | 0.50 | 0.33 | 0.50 | 0.00 | 0.00 | 0.50 | 0.67 | 0.50 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.50 | 0.50 | 1.00 | 1.00 | 0.83 | 0.50 | 0.67 | 0.67 | 0.83 | 0.83 | 0.67 | 0.67 | | |
| 1.3 | 0.00 | 0.17 | 0.00 | 0.67 | 0.33 | 0.50 | 0.17 | 0.50 | 0.00 | 0.33 | 0.83 | 0.33 | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.67 | 0.33 | 0.67 | 0.50 | 0.17 | 0.33 | 0.33 | 0.33 | 0.33 | 0.17 | 0.17 | 0.50 | 0.33 | 0.50 | 0.00 | 0.00 | 0.50 | 0.67 | 0.50 | 0.67 | 0.50 | 0.83 | 0.50 | 0.67 | 0.33 | 1.00 | 1.00 | 0.67 | 0.67 | 0.50 | 0.67 | 0.83 | 0.83 | 0.67 | 0.67 | | |
| 2.1 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.00 | 0.33 | 0.83 | 0.50 | 0.67 | 0.67 | 1.00 | 0.67 | 0.67 | 0.83 | 0.83 | 0.83 | 0.67 | 0.83 | 0.67 | 0.83 | 0.33 | 0.67 | 0.83 | 0.33 | 0.67 | 0.50 | 0.33 | 0.67 | 0.33 | 0.67 | 0.67 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | |
| 2.2 | 0.33 | 0.50 | 0.33 | 0.33 | 0.00 | 0.50 | 0.17 | 0.67 | 0.33 | 0.33 | 0.83 | 0.33 | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.67 | 0.33 | 0.67 | 0.50 | 0.50 | 0.00 | 0.33 | 0.67 | 0.33 | 0.50 | 0.50 | 0.33 | 0.50 | 0.67 | 0.33 | 0.33 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 1.00 | 0.67 | 1.00 | 0.83 | 1.00 | 0.67 | 1.00 | 0.83 | 0.67 | 0.67 | 0.83 | 0.83 | 0.67 | 0.67 | | | |
| 2.3 | 0.50 | 0.67 | 0.50 | 0.83 | 0.50 | 0.00 | 0.50 | 0.83 | 0.50 | 0.50 | 0.67 | 0.50 | 0.33 | 0.33 | 0.00 | 0.17 | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.33 | 0.50 | 0.50 | 0.83 | 0.67 | 0.33 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.50 | 0.50 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 1.00 | 0.67 | 0.83 | 0.83 | 1.00 | 0.67 | 0.83 | 0.67 | 0.67 | 0.50 | 0.67 | 0.50 | 1.00 | 0.83 | 0.67 | |
| 3.1 | 0.17 | 0.33 | 0.17 | 0.50 | 0.17 | 0.50 | 0.00 | 0.67 | 0.17 | 0.33 | 0.83 | 0.33 | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.67 | 0.33 | 0.67 | 0.33 | 0.33 | 0.17 | 0.33 | 0.50 | 0.17 | 0.33 | 0.33 | 0.33 | 0.50 | 0.50 | 0.17 | 0.17 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.83 | 0.67 | 0.83 | 0.67 | 0.83 | 0.50 | 1.00 | 1.00 | 0.67 | 0.50 | 0.67 | 0.83 | 1.00 | 0.83 | 0.67 | | |
| 3.2 | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.67 | 0.67 | 0.83 | 0.67 | 0.00 | 0.50 | 0.50 | 0.67 | 0.67 | 0.83 | 0.83 | 0.83 | 0.83 | 0.50 | 1.00 | 1.00 | 0.67 | 0.67 | 0.50 | 0.50 | 0.67 | 0.33 | 0.50 | 0.50 | 0.67 | 0.50 | 0.50 | 0.67 | 0.83 | 0.67 | 0.67 | 0.83 | 0.67 | 1.00 | 0.83 | 0.83 | 0.67 | 1.00 | 1.00 | 0.83 | 0.83 | 1.00 | 0.83 | 0.83 | 0.67 | 0.67 | 0.83 | | |
| 3.3 | 0.00 | 0.17 | 0.00 | 0.67 | 0.33 | 0.50 | 0.17 | 0.50 | 0.00 | 0.33 | 0.83 | 0.33 | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.67 | 0.33 | 0.67 | 0.50 | 0.17 | 0.33 | 0.33 | 0.33 | 0.33 | 0.17 | 0.17 | 0.50 | 0.33 | 0.50 | 0.00 | 0.00 | 0.50 | 0.67 | 0.50 | 0.67 | 0.50 | 0.83 | 0.50 | 0.67 | 0.33 | 1.00 | 1.00 | 0.67 | 0.67 | 0.50 | 0.67 | 0.83 | 0.83 | 0.67 | 0.67 | | |
| 4.1 | 0.33 | 0.50 | 0.33 | 0.67 | 0.33 | 0.50 | 0.33 | 0.50 | 0.33 | 0.00 | 0.50 | 0.17 | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.67 | 0.00 | 0.50 | 0.67 | 0.50 | 0.17 | 0.33 | 0.50 | 0.17 | 0.33 | 0.33 | 0.33 | 0.50 | 0.50 | 0.17 | 0.17 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 1.00 | 0.67 | 1.00 | 0.83 | 1.00 | 0.67 | 1.00 | 0.83 | 0.67 | 0.67 | 0.83 | 0.83 | 0.67 | 0.67 | | |
| 4.2 | 0.83 | 0.83 | 0.83 | 1.00 | 0.83 | 0.67 | 0.83 | 0.67 | 0.83 | 0.67 | 0.83 | 0.50 | 0.00 | 0.67 | 1.00 | 0.50 | 0.67 | 0.50 | 0.67 | 0.83 | 0.67 | 0.83 | 0.50 | 1.00 | 0.83 | 0.67 | 0.83 | 0.83 | 0.67 | 1.00 | 0.83 | 0.83 | 0.83 | 0.83 | 0.83 | 0.83 | 1.00 | 0.83 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 0.83 | 0.83 | 1.00 | 0.83 | 0.83 | 1.00 | 0.83 | 0.83 | 0.67 | 0.67 | |
| 4.3 | 0.33 | 0.50 | 0.33 | 0.67 | 0.33 | 0.50 | 0.33 | 0.67 | 0.33 | 0.17 | 0.67 | 0.00 | 0.50 | 0.17 | 0.50 | 0.67 | 0.17 | 0.33 | 0.67 | 0.50 | 0.33 | 0.17 | 0.67 | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.67 | 0.33 | 0.33 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 1.00 | 0.67 | 1.00 | 0.83 | 1.00 | 0.67 | 1.00 | 0.83 | 0.67 | 0.67 | 0.83 | 0.83 | 0.67 | 0.67 | | | |
| 5.3 | 0.50 | 0.67 | 0.50 | 0.67 | 0.50 | 0.33 | 0.50 | 0.83 | 0.50 | 0.50 | 1.00 | 0.50 | 0.00 | 0.67 | 0.33 | 0.50 | 0.50 | 0.67 | 0.50 | 0.67 | 0.50 | 0.67 | 0.50 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.83 | 0.83 | 0.83 | 0.83 | 1.00 | 0.83 | 0.83 | 0.83 | 1.00 | 0.83 | 0.83 | 0.83 | 1.00 | 0.83 | 0.83 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 1.00 | 1.00 | 0.83 |
| 6.1 | 0.50 | 0.67 | 0.50 | 0.83 | 0.50 | 0.33 | 0.50 | 0.83 | 0.50 | 0.33 | 0.50 | 0.17 | 0.67 | 0.00 | 0.33 | 0.50 | 0.33 | 0.17 | 0.50 | 0.33 | 0.50 | 0.33 | 0.83 | 0.67 | 0.33 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.83 | 0.50 | 0.50 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 1.00 | 0.67 | 1.00 | 0.83 | 1.00 | 0.67 | 1.00 | 0.83 | 0.67 | 0.67 | 0.83 | 0.83 | 0.67 | 0.67 | | |
| 6.2 | 0.50 | 0.67 | 0.50 | 0.83 | 0.50 | 0.00 | 0.50 | 0.83 | 0.50 | 0.50 | 0.67 | 0.50 | 0.33 | 0.00 | 0.17 | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.33 | 0.50 | 0.50 | 0.67 | 0.83 | 0.67 | 0.33 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.50 | 0.50 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 1.00 | 0.67 | 0.83 | 0.83 | 1.00 | 0.67 | 0.83 | 0.67 | 0.67 | 0.50 | 0.67 | 0.50 | 1.00 | 0.83 | 0.67 | |
| 6.3 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.83 | 0.67 | 0.17 | 0.67 | 0.83 | 0.67 | 0.67 | 0.50 | 0.67 | 0.50 | 0.17 | 0.00 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.50 | 0.17 | 0.33 | 0.50 | 0.17 | 0.33 | 0.33 | 0.33 | 0.50 | 0.67 | 0.33 | 0.33 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 1.00 | 0.67 | 1.00 | 0.83 | 1.00 | 0.67 | 1.00 | 0.83 | 0.67 | 0.67 | 0.83 | 0.83 | 0.67 | 0.67 | | |
| 7.3 | 0.33 | 0.50 | 0.33 | 0.67 | 0.33 | 0.50 | 0.33 | 0.50 | 0.33 | 0.00 | 0.50 | 0.17 | 0.50 | 0.33 | 0.50 | 0.67 | 0.00 | 0.50 | 0.67 | 0.50 | 0.33 | 0.00 | 0.67 | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.67 | 0.33 | 0.33 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 1.00 | 0.67 | 1.00 | 0.83 | 1.00 | 0.67 | 1.00 | 0.83 | 0.67 | 0.67 | 0.83 | 0.83 | 0.67 | 0.67 | | | |
| 8.1 | 0.67 | 0.83 | 0.67 | 0.83 | 0.67 | 0.50 | 0.67 | 1.00 | 0.67 | 0.50 | 0.67 | 0.33 | 0.67 | 0.17 | 0.50 | 0.67 | 0.50 | 0.00 | 0.50 | 0.50 | 0.67 | 0.50 | 0.83 | 0.83 | 0.50 | 0.83 | 0.83 | 0.83 | 0.83 | 0.67 | 0.67 | 0.83 | 0.83 | 0.83 | 0.83 | 0.83 | 1.00 | 0.83 | 1.00 | 0.83 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | |
| 8.2 | 0.50 | 0.67 | 0.50 | 0.67 | 0.50 | 0.50 | 0.33 | 1.00 | 0.50 | 0.67 | 0.83 | 0.67 | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.67 | 0.00 | 0.33 | 0.50 | 0.67 | 0.67 | 0.50 | 0.33 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.50 | 0.50 | 0.83 | 0.83 | 0.83 | 0.83 | 0.83 | 0.83 | 0.83 | 0.83 | 1.00 | 0.83 | 0.83 | 0.67 | 0.67 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | |
| 8.3 | 0.17 | 0.33 | 0.17 | 0.83 | 0.50 | 0.33 | 0.33 | 0.67 | 0.17 | 0.50 | 0.67 | 0.50 | 0.67 | 0.33 | 0.33 | 0.50 | 0.50 | 0.00 | 0.33 | 0.67 | 0.50 | 0.67 | 0.17 | 0.17 | 0.50 | 0.67 | 0.17 | 0.17 | 0.50 | 0.67 | 0.50 | 0.50 | 0.67 | 0.50 | 0.83 | 0.50 | 0.67 | 0.33 | 1.00 | 1.00 | 0.67 | 0.67 | 0.50 | 0.67 | 0.83 | 0.83 | 0.67 | 0.67 | | | | |
| 9.2 | 0.33 | 0.50 | 0.33 | 0.33 | 0.00 | 0.50 | 0.17 | 0.67 | 0.33 | 0.33 | 0.83 | 0.33 | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.67 | 0.33 | 0.67 | 0.50 | 0.50 | 0.00 | 0.33 | 0.67 | 0.33 | 0.50 | 0.50 | 0.33 | 0.50 | 0.67 | 0.33 | 0.33 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 1.00 | 0.67 | 1.00 | 0.83 | 1.00 | 0.67 | 1.00 | 0.83 | 0.67 | 0.67 | 0.83 | 0.83 | 0.67 | 0.67 | | | |
| 9.3 | 0.33 | 0.50 | 0.33 | 0.67 | 0.33 | 0.50 | 0.33 | 0.50 | 0.33 | 0.00 | 0.50 | 0.17 | 0.50 | 0.33 | 0.50 | 0.67 | 0.00 | 0.50 | 0.67 | 0.50 | 0.17 | 0.33 | 0.50 | 0.17 | 0.33 | 0.33 | 0.33 | 0.50 | 0.67 | 0.33 | 0.33 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 1.00 | 0.67 | 1.00 | 0.83 | 1.00 | 0.67 | 1.00 | 0.83 | 0.67 | 0.67 | 0.83 | 0.83 | 0.67 | 0.67 | | | |
| 10.1 | 0.33 | 0.33 | 0.33 | 0.50 | 0.67 | 0.83 | 0.50 | 0.50 | 0.33 | 0.67 | 1.00 | 0.67 | 0.67 | 0.83 | 0.83 | 0.83 | 0.67 | 0.83 | 0.67 | 0.50 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | | | |
| 10.2 | 0.33 | 0.33 | 0.33 | 0.33 | 0.33 | 0.33 | 0.67 | 0.17 | 0.50 | 0.33 | 0.50 | 0.83 | 0.50 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.50 | 0.50 | 0.33 | 0.50 | 0.33 | 0.00 | 0.50 | 0.17 | 0.17 | 0.50 | 0.33 | 0.33 | 0.33 | 0.83 | 0.83 | 0.83 | 0.83 | 0.83 | 0.83 | 0.83 | 0.83 | 0.83 | 0.83 | 0.83 | 0.83 | 0.83 | 0.83 | 0.83 | 0.83 | 0.83 | 0.83 | 0.83 | 0.83 | | |
| 11.1 | 0.17 | 0.33 | 0.17 | 0.83 | 0.50 | 0.33 | 0.33 | 0.67 | 0.17 | 0.50 | 0.67 | 0.50 | 0.67 | 0.33 | 0.33 | 0.50 | 0.50 | 0.00 | 0.33 | 0.67 | 0.50 | 0.67 | 0.17 | 0.17 | 0.50 | 0.67 | 0.17 | 0.17 | 0.50 | 0.67 | 0.50 | 0.50 | 0.67 | 0.50 | 0.83 | 0.50 | 0.67 | 0.33 | 1.00 | 1.00 | 0.67 | 0.67 | 0.50 | 0.67 | 0.83 | 0.83 | 0.67 | 0.67 | | | | |
| 11.2 | 0.17 | 0.17 | 0.17 | 0.50 | 0.50 | 0.67 | 0.33 | 0.33 | 0.17 | 0.50 | 0.83 | 0.50 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.67 | 0.50 | 0.83 | 0.67 | 0.33 | 0.50 | 0.17 | 0.17 | 0.33 | 0.00 | 0.3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

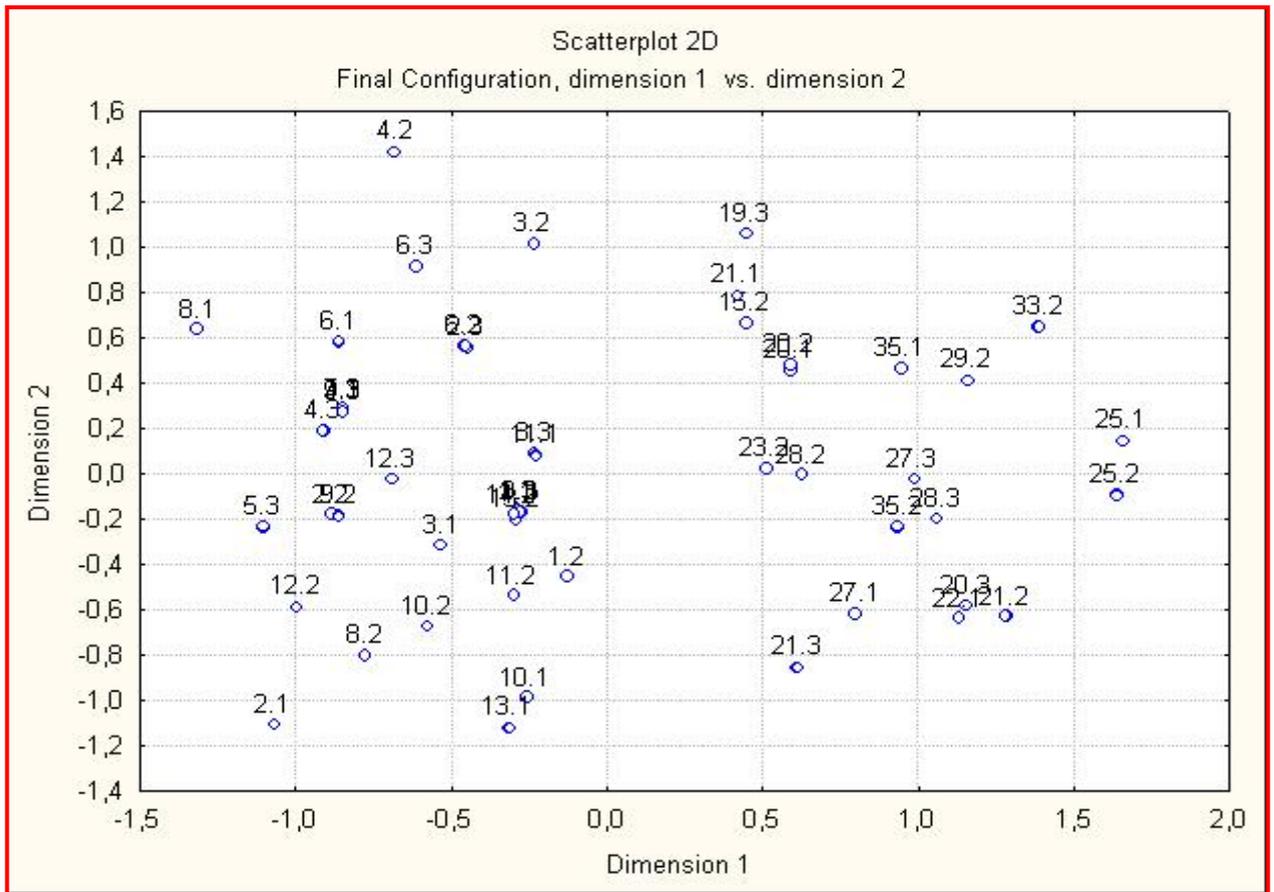


Figura 5. Escalamiento multidimensional (MDS) a partir de la distancia genética en un ensayo de progenie de *T. grandis*.

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica, 2006.

DISCUSIÓN

A pesar de que el protocolo de extracción utilizado está basado en CTAB, y este componente ha permitido extraer ADN de buena calidad en especies como *Fragaria* spp (Porebsky & Bailey, 1997), en la presente investigación se vio que inicialmente el ADN extraído no era de buena calidad, pues al visualizar ADN total en geles de agarosa, se notó que en muchas muestras había barridos. Esto puede indicar que el ADN presentaba cierto grado de degradación. La obtención de ADN degradado pudo deberse tanto a las características de las muestras como a la forma en que se realizó inicialmente la extracción, ya que el tejido utilizado correspondía a hojas muy desarrolladas y que contienen gran cantidad de taninos (algo característico en esta especie), así como fenoles y polifenoles,

los cuales no sólo dificultan la extracción, sino que se transforman en quinonas, sustancias muy oxidantes y degradantes del ADN (Weising & Kahl, 1997).

En un principio se maceraba el tejido directamente en el amortiguador de extracción. De manera que al ser tejido muy desarrollado, presentaba gran cantidad de venas y era de consistencia dura por lo que era difícil macerarlo. Otra causa pudo ser el hecho de que en ocasiones las muestras congeladas de las cuales se extrajo el tejido se descongelaban antes de que al tejido se le adicionara el amortiguador de extracción. Algo no aconsejable, pues al descongelarse ciertas enzimas celulares pueden degradar el ADN (Weising & Kahl, 1997). Sin embargo, al implementar una maceración en nitrógeno líquido se notó que no se visualizaban barridos. Por lo que el ADN obtenido era de buena calidad, pero la intensidad de las bandas de alto peso molecular no era suficiente. Como se aprecia en el Anexo 2, la cantidad de ADN obtenida no fue alta (73,64 ng/μL en promedio).

El nitrógeno líquido permitió una mejor maceración del tejido y por ende un mayor rompimiento del tejido (Shepherd *et al*; 2002) por lo que la acción de ciertos componentes del amortiguador de extracción fue más efectiva. Esos ingredientes a los que se hace referencia son el CTAB, que forma un complejo con el ADN previniendo su degradación. Además, se puede precipitar con isopropanol (Weising & Kahl, 1997). El PVP fue usado para remover compuestos polifenólicos al formar puentes de hidrógeno con ellos, permitiendo separarlos del ADN por medio de centrifugación (Lodhi *et al*, 1994).

La incorporación de nitrógeno líquido en este protocolo permitió obtener ADN de buena calidad, pero la poca cantidad de esta molécula se pudo haber debido al estado de desarrollo del tejido. Pues conforme el tejido foliar madura, las cantidades de polifenoles, taninos y polisacáridos aumentan en relación con la del ADN (Porebsky & Bailey, 1997). No obstante, no fue posible recolectar mucho tejido en estado juvenil, ya que *T. grandis* no presentaba brotación al momento en que se realizó la colecta de material (finales del mes de julio) temporada previa a la floración (Fonseca, 2004). Lo recomendable es usar brotes en estado activo de elongación, pues presentan una mayor tasa de división celular y por ende mayor contenido de ADN (Lodhi *et al*; 1994).

El protocolo de extracción tuvo otras modificaciones además del uso de nitrógeno líquido, pues en lugar de agregar 2 volúmenes de etanol absoluto frío antes de incubar las muestras a -15°C , se agregó 0,5 volúmenes de agua destilada estéril, 0,5 volúmenes de NaCl 5M y 0,6 volúmenes de Isopropanol frío. Esto con el objetivo de mantener los polisacáridos en solución y evitar que precipitaran junto con el ADN durante su extracción. En términos generales estos cambios resultaron ser útiles. Permitieron obtener ADN de buena calidad y apto para la PCR a partir de tejido con alto contenido de polisacáridos y en estado de desarrollo avanzado.

A pesar de que se obtuvo una cantidad relativamente baja de ADN y de las dificultades implicadas en su extracción, lo que se buscaba era que fuese apto para realizar las PCRs. Por lo que se hizo una prueba preliminar con el par de imprimadores TG-AC01 con el perfil térmico antes descrito y la mezcla de PCR establecida por Schuelke (2000) con ciertas modificaciones. Respecto a esas modificaciones, se puede apreciar en el cuadro 2 que las concentraciones de los imprimadores (forward primer y reverse primer) son diferentes. Eso se debe a que inicialmente este protocolo se desarrolló para obtener productos de PCR capaces de producir fluorescencia. Ya que el imprimador que copia hacia delante (forward primer) incluye una secuencia conocida como *cola M13* en su extremo 5', la cual es complementaria al imprimador universal marcado con fluorescencia M13 (el cual no se incluyó en esta investigación). De manera que durante la PCR, el imprimador con la cola M13 genera una secuencia complementaria para que se una el imprimador universal marcado con un fluorocromo, por lo que se obtienen productos de PCR marcados (Verhaegen *et al*; 2005).

Por lo tanto, el imprimador que va a ser marcado es el que se agrega en menor concentración. Originalmente Schuelke (2000) estableció una mezcla en la que el imprimador marcado era el que copia hacia delante, sin embargo en *T. grandis* se ha marcado el que copia en reversa (Verhaegen *et al*; 2005) utilizando microsatélites. Las concentraciones de los reactivos para la PCR tuvieron que ajustarse en esta investigación ya que no se tenía previsto hacer análisis en secuenciador. De la misma manera se tuvo que ajustar las concentraciones finales de ADN de las muestras a $5\text{ ng}/\mu\text{L}$ (se hicieron diluciones a partir de todas las muestras extraídas) por lo que se probó agregando $8\ \mu\text{L}$ de ADN (40 ng) a la

mezcla. En la figura 2 se evidencia que con la mezcla de PCR empleada en esta investigación se dio amplificación, lo cual confirma la ventaja del análisis con microsatélites, pues éste requiere cantidades pequeñas de ADN, de hasta 25 ng (Verhaegen *et al*; 2005) en comparación con otros marcadores como los AFLP donde se pueden necesitar hasta 500 ng (Shrestha *et al*; 2005).

En la figura 2 también se puede apreciar que en el carril correspondiente al control no se presentó amplificación, lo cual indica ausencia de contaminación en los reactivos de PCR. Ya sea con ADN del ambiente o proveniente de productos de reacciones anteriores, lo cual representa uno de los mayores cuidados que deben tenerse en esta técnica (Valadez & Kahl, 2000).

Luego de esta prueba se realizaron las PCRs para 7 pares de imprimadores y en 81 individuos. De manera que una vez realizadas se tomó una muestra aleatoria de productos amplificados y se visualizaron en un gel de agarosa, antes de realizar las electroforesis en geles de poliacrilamida y tomar datos. En ese gel de agarosa (Figura 3) se aprecia que los productos de PCR tienen un tamaño cercano a 200 pb, lo cual coincide con datos obtenidos en un secuenciador analizando productos de estos mismos imprimadores. Sin embargo, se aprecia una banda muy tenue de aproximadamente 50 pb en algunos carriles que pueden corresponder ya sea a amplificaciones inespecíficas o a dímeros de imprimadores. No obstante, el control no correspondía al de los imprimadores con los que se vieron esas bandas, de allí que no se puede afirmar a ciencia cierta si corresponden a amplificaciones inespecíficas o a dímeros de imprimadores.

En lo referente a la visualización de los productos de PCR en geles de poliacrilamida, sólo 6 geles se usaron para el análisis de datos (correspondientes a los pares de imprimadores TG-AC01, TG-AG16 y TG-ATC02) puesto que los geles correspondientes al resto de imprimadores, o bien presentaron problemas de tinción (probablemente debido a reactivos de baja calidad) que impedían ver claramente un patrón de bandas, o el patrón de bandas obtenido era muy ambiguo y difícil de interpretar (muchas bandas por carril con el par de imprimadores TG-ADH-MS y TG-CPI-MS). Esto sugiere que quizás la temperatura de apareamiento no sea la adecuada para estos imprimadores, por lo que se presentan esas posibles amplificaciones inespecíficas. Sin embargo, debe recordarse que en este tipo de geles se dan ciertos fenómenos que complican el

análisis de bandas como lo son la presencia de bandas menores: *Heteroduplex*, *Shadow bands* y *faint bands* (Rodríguez *et al*; 2001).

Al analizar los datos obtenidos con 3 pares de microsatélites en geles de poliacrilamida se pudo determinar que en términos generales el tamaño promedio de los alelos en cada locus es muy cercano a los 200 pb. Esto pudo determinarse según las electroforesis realizadas previamente en geles de agarosa. A pesar de ello, se demuestra que es preferible realizar este tipo de análisis en geles de poliacrilamida. Puesto que permite determinar el tamaño de los alelos con mayor exactitud, pues son aptos para separar fragmentos muy pequeños de ADN (5-500 bp). Además su capacidad de resolución es tan grande que permite separar fragmentos de ADN que difieren de hasta en 1bp (Phillips-Mora *et al*; 1995).

Por otro lado, el valor de R^2 es un valor que indica la exactitud de la determinación del tamaño de los alelos. Por lo tanto, al obtenerse valores altos como 0,992, se puede decir que la determinación del tamaño de los alelos en esta investigación fue muy exacta, esto debido a que se tomaron en cuenta todas las bandas de los marcadores de peso molecular al momento de realizar ese análisis.

El número de alelos obtenidos en cada locus no fue alto, pues se obtuvo una media de 8,33 alelos por locus, mientras que en otro estudio con esta especie (Verhaegen *et al*; 2005) se obtuvo en promedio 14,7 alelos por locus, pero utilizando 15 microsatélites en lugar de 3. Conviene hacer ciertas aclaraciones sobre la definición de alelo, pues según la terminología clásica de genética, los alelos se entienden como formas alternativas de un mismo gen que están presentes en locus; sin embargo, en este tipo de análisis usando marcadores moleculares, el término alelo se aplica a cualquier segmento del genoma que ocupa las mismas posiciones en los cromosomas pareados de las células somáticas, lo cual no sólo abarca a los genes, sino también regiones no codificantes (Phillips-Mora *et al*; 1995).

Se debe tener cuidado al analizar el número de alelos obtenidos por locus, pues es probable que al realizar esta determinación usando más microsatélites, éste promedio pueda aumentar o disminuir. De igual forma, algunos autores (Valadez & Kahl, 2000) afirman que el número de alelos por locus en plantas es menor en comparación al que presentan los animales. Esto puede deberse a los

procesos de retrocruzas, propagación vegetativa y selección realizada por el ser humano en estas especies. Ese último punto es de importancia para este estudio, ya que lo que se está analizando es la descendencia de un conjunto de árboles plus seleccionados por sus características. De manera que si se analizara también la descendencia de otros árboles (no catalogados como árboles plus) este valor podría ser diferente.

En esta investigación se puede afirmar que los 3 loci analizados son polimórficos, puesto que la frecuencia de los alelos más comunes para cada uno de ellos es menor a 0,95 (Nason, 2002). Sin embargo, se puede apreciar la presencia de alelos con frecuencias muy bajas, es decir con una frecuencia igual a 0,01 (Buchert *et al*; 1997), por ejemplo los alelos 1, 6 y 8 en el locus C. Estas frecuencias tan bajas podrían deberse quizás al tamaño de la muestra analizada, pues es probable que si se hubiesen monitoreado mayor número de individuos por familia, esas frecuencias quizás serían diferentes. Entonces, a partir de ese resultado se puede suponer también que probablemente no se capturaron alelos que están presentes en la población, pero que no se detectaron por el tamaño de la muestra. De allí que es necesario establecer un tamaño mínimo para la muestra con el fin de detectar el mayor número de alelos posibles y poder saber si se pueden catalogar como raros.

Con base en lo anterior, si en un futuro se repitiera este estudio con una mayor cantidad de individuos por familia y si se obtienen resultados similares, se debería tomar en cuenta la presencia de esos alelos raros a la hora de tomar decisiones relacionadas al manejo del ensayo (como el establecimiento de huertos semilleros). Ya que el mejoramiento genético debe impedir la pérdida de ese tipo de alelos y mantener así la diversidad en el acervo genético de las poblaciones manejadas.

A partir de las frecuencias alélicas observadas en el cuadro 5 se pudo determinar que tan informativos son los loci estudiados mediante la determinación del PIC. Originalmente esta medida ha sido utilizada para medir el polimorfismo de marcadores en estudios de ligamiento y en el estudio de transmisión de enfermedades humanas (Guo & Elston, 1999). Por lo tanto, se puede utilizar para estimar qué tan variables (polimórficos) son los loci estudiados y hasta para estimar la diversidad genética a nivel de población (Nason, 2002).

En este estudio, los loci A y C presentan valores muy similares de PIC (0,56 y 0,62 respectivamente) mientras que para el locus B este valor es mayor (0,73). El PIC promedio obtenido fue de 0,64, el cual es menor al obtenido en clones de *Vochysia guatemalensis* (Rojas, 2005), que fue de 0,77. Sin embargo en ese estudio con *V.guatemalensis* no fue tan alto como el encontrado en *Eucalyptus grandis* (0.83 en promedio, siendo 0.93 el valor más alto), esto al analizar una población de 192 individuos con 6 microsatélites (Kirst *et al*; 2005). Algunos árboles de esa población formaban parte de ensayos de progenie. En un estudio realizado en una población de individuos (no clones) de *Cryptomeria japonica*, también con microsatélites, el PIC promedio fue de 0,62, por lo que se puede afirmar que los loci estudiados en esta investigación son variables (Tani *et al*; 2004).

La razón de porqué tanta variabilidad en los loci (medida a través del número de alelos y el PIC) aún no está clara, pero se cree que estos loci están localizados preferiblemente en regiones que presentan poca transcripción en el genoma de las plantas (Kirst *et al*; 2005). Aunque Tani *et al* (2004) afirman que puede haber una posible correlación entre la longitud de las unidades repetidas de los microsatélites y el PIC.

Respecto a la diversidad genética, se aprecia una tendencia similar a la observada en el PIC, ya que el locus A y C cuentan con valores similares (2,3 y 2,7 respectivamente) mientras que ese valor para el locus B es mayor (3,7) lo cual indica que en dicho locus la distribución de alelos es mejor que en los loci A y C. Además, esos dos loci presentan menor diversidad genética puesto que en términos generales, en ambos loci predomina el alelo 5 (frecuencia de 0,647 en el locus A y de 0,5 en el C). Por el contrario, en el locus B a pesar de que predomina el alelo 3 (frecuencia de 0,451) se ve que los alelos 2, 4 y 6 tienen frecuencias muy parecidas (0,098 y 0,078), es decir, para el locus B, las frecuencias alélicas son más similares entre sí, en comparación con los otros loci.

Estos datos demuestran que el locus con mayor número de alelos, es el A. Sin embargo, no necesariamente es el más diverso. La diversidad se mide en términos de distribución alélica. También debe tomarse en cuenta el hecho de que cabe la posibilidad de que hayan loci más diversos. Lo cual no se pudo determinar en este trabajo, pues no se pudieron obtener datos de los 4 microsatélites

restantes. Generalmente, valores relativamente bajos de diversidad genética denotan menor polimorfismo al haber un alelo con una muy alta frecuencia y pocos alelos raros. Por lo tanto se puede afirmar que los valores de diversidad obtenidos no son muy bajos, pues en otras especies forestales como *Nothofagus nervosa* (Marchelli & Gallo, 2001) donde se compararon 11 poblaciones, la diversidad abarcaba valores entre 1,177 y 1,362. Mientras que en *Gmelina arborea* (Araya *et al*; 2005c) los valores son aún menores (0,15), no obstante, esos estudios se realizaron con isoenzimas y AFLPs por lo que es aconsejable realizar estudios similares usando microsatélites en otros ensayos de progenie de *T. grandis*, y así tener un punto de comparación más acertado. Aunque en *V.guatemalensis*, la diversidad genética obtenida con microsatélites fue mayor (4,72 en promedio).

Con base en los resultados de PIC y de diversidad genética se puede afirmar que la base genética de este programa de mejoramiento genético en *T.grandis* es buena.

La determinación de la huella genética (fingerprint) fue posible una vez que se le asignó el genotipo a cada uno de los individuos. De manera que cada individuo cuenta con una huella genética única, no obstante, para establecerla se debe tener cuidado en el número de marcadores utilizados. Puesto que si el número utilizado es muy bajo, es probable que en análisis posteriores de parentesco 2 o más individuos resulten estar estrechamente relacionados más por coincidencia y no porque comparten mucho material genético. Al usar pocos marcadores es más probable que la huella sea igual o muy similar, pero conforme aumenta su número esa posibilidad se reduce (Valadez & Kahl, 2000). A manera de ejemplo, en el cuadro 6 se observa que los individuos 1.1 y 1.3 cuentan con la misma huella genética, lo cual podría interpretarse erróneamente como clones de un mismo individuo. Algo que al menos en este estudio no es cierto, pues ambos son descendientes de un mismo árbol plus o familia obtenidos a través de semilla. Por lo tanto, 3 loci investigados no son suficientes para discriminar entre individuos muy emparentados

De allí que las huellas presentadas no deben tomarse como absolutas ya que ésta varía según el número de microsatélites analizados, por lo que también se debe precisar un mínimo de microsatélites utilizados para obtener datos que

puedan considerarse precisos. En *T. grandis* se ha determinado la huella genética en clones con 10 microsatélites (Araya *et al*; 2005a) y recientemente se han desarrollado otros 15 (Verhaegen *et al*; 2005), con los que se podría determinar una huella genética con mayor certeza.

También está el problema de que no todas las muestras presentaron amplificación con los 3 microsatélites, probablemente debido a la calidad de esas muestras de ADN. Pues se sabe que si hay contaminación con polisacáridos u otras sustancias, éstas podrían inhibir la acción de la Taq polimerasa (Weising & Kahl, 1997). Hubo problemas en la determinación de la pureza de las muestras de ADN extraídas pues las lecturas daban valores superiores al 100 % o negativos (por esa razón no se incluyó pureza en el anexo 2). Lo cual sugiere cierta contaminación como causa de esas lecturas. No obstante, no se debe dejar de lado la posibilidad de posibles alelos nulos, alelos que no se detectan debido a una mutación en la región donde se une el imprimador (Rodríguez *et al*, 2001), mas el análisis de ese fenómeno no es un objetivo de esta investigación por lo que se tomaron los datos como perdidos.

La determinación del genotipo y de la huella genética permitió establecer la distancia genética entre los individuos, es decir, su grado de parentesco. A partir de esos datos se generó una matriz (ver cuadro 7) en la cual el valor máximo de 1 significa que no comparten nada de su material genético, mientras que el valor mínimo (0) significa que comparten la totalidad de su material genético. Es decir, conforme más pequeño sea este valor entre 2 individuos, más emparentados van a estar.

El hecho de que el individuo 25.1 tenga una distancia genética promedio de 0,82 significa que éste comparte sólo un 18 % de su material genético con el resto de los individuos analizados. Para analizar de manera más fácil estos datos se realizó un escalamiento multidimensional (MDS), cuya finalidad es establecer una representación gráfica a partir de un conjunto de similitudes o distancias (como las presentes en la matriz) observadas entre un par de objetos. De manera que las posiciones de esos objetos en la figura se ajustan lo máximo posible a las similitudes o distancias originales (Marín, 2006).

Si para el análisis se usan magnitudes se habla de un escalamiento multidimensional métrico, siendo éste el caso de la presente investigación.

Mientras que si lo que se utilizan son rangos, el escalamiento es no métrico. En la figura lo que se requiere es que se mantenga el orden y no la magnitud, de manera que grandes distancias en la matriz original, también sean grandes en la figura (Marín, 2006; Valadez & Kahl, 2000).

En la figura 5, entre más cercanos estén colocados los individuos unos de otros, mayor será su grado de parentesco. En la figura 5, a pesar de que no se ve que los individuos estén distribuidos por todo el espacio, tampoco están todos agrupados en un único sector, lo cual indicaría que las progenies estarían muy emparentadas, además, evidenciaría un problema en el programa de mejoramiento genético. Ya que al haber mucho parentesco, la diversidad genética es baja, mientras que los programas de mejoramiento genético en teoría deben conservar la mayor diversidad posible.

No obstante, la distribución de los individuos es buena, viéndose 2 grandes grupos, dejando el área intermedia del gráfico prácticamente vacía. Por lo tanto, los individuos en cada grupo van a estar más relacionados con los de su mismo grupo que con los del otro grupo. Conviene señalar que uno de estos grandes grupos está compuesto prácticamente por individuos de familias de número bajo (1-14) mientras que el otro por el resto de las familias (15 en adelante). Dentro de esos grupos, se pueden establecer aún subgrupos donde los individuos presentes tienen todavía un nivel de parentesco mayor y en ellos puede haber individuos provenientes de la misma familia (como los árboles 25.1 y 25.2) o de familias diferentes (árboles 10.1 y 13.1). Aunque el hecho de que dos individuos provengan de la misma familia necesariamente no significa que aparezcan estrechamente relacionados, pues está el caso de los individuos 8.1 y 8.2, que sólo tienen un 50 % de parentesco.

En este tipo de análisis se debe tener el mismo cuidado de interpretación que en la interpretación de la huella genética. Pues si 2 o más individuos se presentan superpuestos en la representación gráfica (es decir, su valor de distancia genética es 0), no significa que sean el mismo individuo sino que pueden estar muy emparentados, pero quizá el número de marcadores analizados no es suficiente para tener una estimación certera de cuán relacionados están en realidad. Igual consideración se debe tener en el caso contrario, pues una distancia de 1 no indica que los individuos de diferentes

familias no tengan nada de su ADN en común. Aunque es posible que con un número mayor de marcadores todos los resultados puedan cambiar.

La distribución de las familias en la figura 5 hasta cierto punto es coherente con los resultados de diversidad genética y del PIC. Pues coinciden en que el ensayo de progenie analizado presenta una diversidad genética no muy alta. Por otro lado, queda la interrogante de por qué parece que 2 grandes grupos abarcan el ensayo en partes casi iguales y porqué muchos individuos provenientes de diferentes familias se agrupan aún más estrechamente que individuos de la misma familia en algunos casos.

Para responder lo anterior se pueden hacer varias suposiciones partiendo del hecho de que el parentesco implica que se comparten ancestros en común. De manera que si los árboles madre (familias) están muy relacionadas entre sí, sus progenies pueden presentar alto parentesco. Por lo tanto, se podría pensar que los árboles madre representados en un grupo están muy relacionados entre sí, pero a su vez tienen poco parentesco con los árboles plus representados a través de su progenie en el otro grupo. Ya sea porque sus procedencias originales sean distintas o porque los árboles plus no provienen de la misma población (la semillas se recolectaron de árboles seleccionados en Guanacaste y Puntarenas), sin embargo, aún no se han hecho determinaciones de qué tan emparentados están los árboles madre.

También cabe la posibilidad de que se diera polinización entre los árboles madre, de manera que su descendencia podría compartir mucho de su material genético, a pesar de que se obtuviera la semilla de diferentes árboles. Otra posibilidad es que las progenies compartan un ancestro común, que no necesariamente sea otro de los árboles madre, sino que el polen podría provenir del o de los mismos árboles. Aunque éstos no hayan sido seleccionados como árboles madre, o quizás se dio interacciones entre todos estos posibles acontecimientos.

Pero no debe dejarse por fuera la actividad de los polinizadores, porque la estructura genética de las poblaciones determinada por marcadores heredados tanto del óvulo como del polen, como es el caso de los microsatélites, es en cierta forma consecuencia de la dispersión del polen. Por lo que entran en juego factores como la proporción de árboles en flor y si la floración se presenta en

forma coordinada, o la capacidad de movilización del polinizador (Nason, 2002). Si la floración no se da coordinada es probable que el polinizador se limite a frecuentar un mismo grupo de árboles durante cierto tiempo. Luego se podría limitar a otro grupo, por lo que la descendencia dentro cada grupo estaría muy emparentada. Aunque entre los dos grupos, el parentesco de la descendencia sería menor. No obstante, se debe aclarar que los escenarios descritos anteriormente se plantean como posibilidades y no como absolutos, puesto que entre los objetivos de esta investigación no estaba el analizar directamente los árboles plus ni estudiar la dispersión de polen en poblaciones de *T. grandis*.

Los datos obtenidos también pueden utilizarse para determinar el grado de parentesco de las progenes de familias que presentan características superiores y también qué tan emparentadas están de las peores familias respecto a esas características. Anteriormente Araya *et al* (2005b) determinaron que en ese mismo ensayo de progenie, las 2 familias que presentaban el mayor índice de calidad (27 y 14) se agrupaban compartiendo un 61,63 % del material genético. El estudio se realizó utilizando marcadores AFLP, no obstante, en la presente investigación, con microsatélites se determinó que la semejanza entre esas dos familias es de aproximadamente un 30%, casi la mitad de lo determinado por ese estudio.

Uno de los objetivos del uso de marcadores moleculares en el mejoramiento genético forestal es determinar si hay ligamiento entre un marcador observado y una característica de interés como la calidad del árbol y la producción volumétrica para poder realizar una selección temprana del material. No obstante, la producción volumétrica, al ser una característica cuantitativa va a estar determinada por varios genes y en parte va a depender del ambiente, por lo que se necesitarían analizar marcadores presentes en una región del genoma que controla un fenotipo por medio de la interacción cooperativa de varios genes, es decir QTL (loci de un carácter cuantitativo). Por lo tanto, se deben tomar los datos arrojados por marcadores moleculares con cuidado (O' Malley & Whetten, 1997).

Igualmente, se ha afirmado que la determinación de diversidad genética mediante marcadores moleculares no refleja necesariamente los patrones de diferenciación en caracteres cuantitativos (O' Malley & Whetten, 1997). Finalmente, se puede afirmar que el establecimiento de la huella genética para

individuos del ensayo de progenie analizado en esta investigación, así como la determinación de la diversidad genética, pueden ser de gran utilidad para las siguientes etapas del programa de mejoramiento, como es el establecimiento de huertos semilleros. Ya que es necesario conocer la identidad del material con que se trabaja y para saber si los resultados obtenidos se mantienen o cambian significativamente.

CONCLUSIONES

- Un protocolo de extracción de ADN que utilice CTAB y PVP permite obtener ADN apto para PCR con microsatélites a partir de tejido maduro y con muchos taninos.
- Los microsatélites resultan una técnica muy práctica en el análisis de una gran cantidad de muestras.
- Los microsatélites son marcadores con los cuales se puede obtener una gran cantidad de información.
- La determinación de la huella genética y del parentesco entre familias se ven muy influidas por el número de marcadores usados.

RECOMENDACIONES

- Recolectar las muestras de tejido en una época donde sea posible encontrar tejido joven como el de los brotes.
- Establecer un tamaño adecuado de muestra, de manera que los resultados sean más representativos respecto a la totalidad de la población.
- Revisar y comprobar que las temperaturas de apareamiento de los imprimadores sean las adecuadas y hacer pruebas para detectar posible contaminación.
- Verificar la calidad de los reactivos utilizados en el proceso de tinción de los geles de poliacrilamida.
- Repetir este estudio o realizarlo en otros ensayos de progenie de *T. grandis* con un número mayor de microsatélites y así poder hacer una comparación entre los resultados obtenidos.

LITERATURA CITADA

- Aragonés, A; Murga, A; Espinel, S; Ritter, E. 2001. **Mapa Genético en Especies Forestales** <<http://www.nasdap.ejgv.euskadi.net/r50468/eu/contenidos/informacion/3269/eu_2608/adjuntos/58_40_41_c.pdf>> Fecha de revisión: 11 de junio, 2006.
- Araneda, C. 2004. **Apunte de marcadores moleculares.** <<<http://www.cfg.uchile.cl/fg/semestre2/2004/biotec/modulo2/clase2/doc/marcadores.pdf#search=%22Marcadores%20moleculares%22>>>. Fecha de revisión: 16 de septiembre, 2006.
- Araya, E; Murillo, O; Rocha, O. 2003. **Mejoramiento Genético Forestal Asistido por Marcadores Genéticos.** En: IV Congreso Forestal Nacional. 17-19 septiembre, 2003. San José, Costa Rica.
- Araya, E.; Murillo, O.; Aguilar, G. & Rocha, O. 2005a. **Uso de marcadores genéticos en silvicultura clonal.** En: Seminario Taller "Avances en Silvicultura Clonal". 26-27 julio, 2005, Escuela de Ing. Forestal, Instituto Tecnológico de Costa Rica. San José, Costa Rica. CD.
- Araya, E; Murillo, O; Aguilar, G; Rocha, O; Woolbright, S; Keim, P. 2005b. **Possibilities of Breeding Teak (*Tectona grandis*) in Costa Rica assisted by AFLP markers.** Kurú 2(5). Versión digital del 31 de agosto del 2005. 8p.
- Araya, E; Murillo, O; Aguilar, G; Rocha, O. 2005c. **Relaciones genéticas en una colección de clones de *Gmelina arborea* (Roxb) reveladas con marcadores AFLP.** Kurú 2(6). 14p.
- Buchert, G; Rajora, P; Hood, J; Dancik, B. 1997. **Effects of harvesting on genetic diversity in old-growth eastern white pine in Ontario, Canada.** Conservation Biology. 11 (3): 747-758.

- Chambers,G; McAvoy, E. 2000. **Microsatellites: consensus and controversy.** Comparative Biochemistry and Physiology. Part B 126. Pp: 455-476.
- Changtragoon, S. 2003. **The potential for using molecular markers to facilitate gene management and the *in situ* and *ex situ* conservation of tropical forest trees.** En: Forest genetic resources conservation and management Proceedings of the Asia Pacific Forest Genetic Resources Programme (APFORGEN) Inception Workshop. Editado por: T. Luoma-aho, L.T. Hong, V. Ramanatha Rao, H.C. Sim. Kepong, Kuala Lumpur, Malaysia,15–18 July, 2003.
- Changtragoon,S; Szmidt, A. 2000. **Genetic diversity of teak (*Tectona grandis* Linn. F.) in Thailand revealed by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD).** Pp. 82-83. En: IUFRO Working Party 2.08.01 Tropical Species Breeding and Genetic Resources: Forest Genetics for the Next Millennium. Durban, South Africa. 8–13 October 2000.
- Claros, G. 1998. **Marcadores Moleculares: Qué son, cómo se obtienen y para qué valen.** <<http://www.encuentros.uma.es/encuentros49/marcadores.html>> Fecha de revisión: 16 de septiembre, 2006.
- Ferreira, M; Grattapaglia, D. 1998. **Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético.** 1 ed. Brasilia: Embrapa-Cenargen. 220 p.
- Fonseca, W. 2004. **Manual para productores de teca (*Tectona grandis* L.f) en Costa Rica** <<<http://www.fonafifo.com/textfiles/proyectos/ManualProductoresTeca.pdf>>> Fecha de Revisión: 16 de septiembre, 2006.

- Francis, J. 2003. *Tectona grandis* L.f. <<<http://www.rngr.net/Publications/ttsm/Folder.20030711.4726/PDF.2004-03-16.5641/file>>> International Institute of Tropical Forestry, USDA Forest Service. Fecha de revision: 11 de junio, 2006.
- Gregorius, H.R. 1978. **The concept of genetic diversity and its formal relationship to heterozygosity and genetic distance.** Math. Biociencias 41:253-271.
- Guo, X; Elston, R. 1999. **Linkage information content of polymorphic genetic markers.** Human Heredity. 49: 112-118.
- Hajeer, A; Worthington, J; John. S. 2000. **SNP and microsatellite genotyping: Markers for genetic analysis.** In: Biotechniques: Molecular laboratory methods series. Eaton Publishing, Manchester, U.K.
- Jarne, P; Lagoda, P.1996. **Microsatellites, from molecules to populations and back.** Trends in Ecology and Evolution 11 (10): 424-429.
- Karp, A; Edwards, K. 1997. **DNA Markers: a global review.** In: DNA Markers: Protocols, Applications and Overviews. Edited by: Caetano-Anollés, G; Gresshoff, P. Ed. Wiley-Liss, Inc. USA. Pp: 27-30.
- Kertadikara, A-W; Prat, D. 1995. **Isozyme variation among teak (*Tectona grandis* L.f) provenances.** Theoretical and Applied Genetics. 90: 803-810.
- Kirst, M; Cordeiro,C; Rezende, G; Grattapaglia, D. 2005. **Power of microsatellite markers for fingerprinting and parentage analysis in *Eucalyptus grandis* breeding populations.** Journal of Heredity. 96 (2): 161-166.
- Kjaer, E-D; Siegismund, H-R. 1996. **Allozymes diversity in two Tanzanian and two Nicaraguan landraces of teak (*Tectona grandis*, L).** Forest Genetics 3: 45-52.

- Kjaer, E.D; Foster, GS. 1996. **The economics of tree improvement of teak.** Technical Note. 43. Danida Forest Seed Centre. Humlebaek. Denmark.
- 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.
- Marchelli, P; Gallo, L. 2001. **Genetic diversity and differentiation in a southern beech subjected to introgressive hybridization.** Heredity 87: 284-293.
- Marín, J. 2006. **Tema 5: Análisis de Cluster y Multidimensional Scaling.** <<<http://halweb.uc3m.es/esp/Personal/personas/jmmarin/esp/AMult/tema5am.pdf>>>. Universidad Carlos III de Madrid. Fecha de revisión: 28 de diciembre, 2006.
- Mohammadi, S.A; Prasanna, B.A. 2003. **Analysis of Genetic Diversity in Crop Plants—Salient Statistical Tools and Considerations.** Crop Science. 43:1235–1248.
- Moxon, E; Wills, C. 1999. **DNA microsatellites: agents of evolution?** Scientific American Enero: 94-99.
- Nason, J. 2002. **La estructura genética de las poblaciones de árboles. En: Ecología y conservación de bosques neotropicales.** Editado por: Guariguata, M & Kattan, G. Ediciones LUR. Cartago, Costa Rica. pp: 300-327.
- O'Malley, D; Whetten, R. 1997. **Molecular markers and forest trees.** In: DNA Markers: Protocols, Applications and Overviews. Edited by: Caetano-Anollés, G; Gresshoff, P. Ed. Wiley-Liss, Inc. USA. Pp: 237-258.

- Phillips-Mora, W; Rodríguez, H; Fritz, P. 1995. **Marcadores de ADN: Teoría, Aplicaciones y Protocolos de Trabajo. Con ejemplos de investigaciones en cacao (*Theobroma cacao*)**. Centro Agronómico de Investigación y Enseñanza (CATIE). Turrialba, Costa Rica. 184p.
- Porebsky, S; Bailey, G. 1997. **Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components**. Plant Molecular Biology Reporter 15 (01). 8p.
- Rodríguez, S; Visedo, G; Zapata, C. 2001. **Detection of errors in dinucleotide repeat typing by nondenaturing electrophoresis**. Electrophoresis. 22: 2656-2664.
- Rojas, J. L. 1999. **Contribuciones al Fortalecimiento del Programa de Mejoramiento Genético del CACH**. Práctica de Especialidad. BS. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Escuela de Ingeniería Forestal. Cartago, Costa Rica. 100 p.
- Rojas, F. 2005. **Evaluación de microsatélites para el análisis de las relaciones genéticas en clones de *Vochysia guatemalensis***. Práctica de Especialidad. BS. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Escuela de Biología. Cartago, Costa Rica. 69 p.
- Schlotterer, C; Tautz, D. 1992. **Slippage synthesis of simple sequence DNA**. Nucleic Acid Researchs 20 (2): 211-215.
- 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.
- Shepherd, M; Cross, M; Stokoe, R; Scout, L; Jones, M. **High-Throughput DNA extraction from forest trees**. 2002. Plant Molecular Biology Reporter 20: 425a-425j.

- Shrestha, M; Volkaert, H; Van Der Straten, D. 2005. **Assessment of genetic diversity in *Tectona grandis* using Amplified Fragment Length Polymorphism markers.** Canadian Journal of Forest Research. 35: 1017-1022.
- Suangtho, V; Graudal, L; E.D. Kjaer. 1999. **Genecological zonation as a tool in conservation of genetic resources of teak (*Tectona grandis*) in Thailand.** From an international teak conference 'Teak Beyond 2000', 23-25 August 1999, Chiang Mai, Thailand. 8 p.
- Tani, N; Takahashi, T; Ujino-Ihara, T; Iwata, H; Yoshimura, K; Tsumara, Y. 2004. **Development and characteristics of microsatellite markers for sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don) derived from microsatellite-enriched libraries.** Annals of Forest Science. 61: 569-575.
- Valadez, E; Kahl, G, 2000. **Huellas de ADN en genomas de plantas (Teoría y protocolos de laboratorio).** Mundi-Prensa. México D.F. México. 144 p.
- Verhaegen, D; Ofori, D; Fofana, I; Poitel, M; Vaillant, A. 2005. **Development and characterization of microsatellite markers in *Tectona grandis* (Linn.f).** Molecular Ecology Notes. 5: 945-947.
- Villamón, F. 2000. **Caracterización de microsatélites de *Solanum tuberosum* Subsp *tuberosum* y en las otras especies de papa cultivada.** Tesis para optar Título de Biólogo. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Mayor San Marcos. Lima, Perú.
- Volkaert, H. 2002. **Pollination events in a teak seed orchard.** Datos sin publicar. Centre for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University Kampaengsaen Campus, Kampaengsaen, NakornPathom, 73140, Thailand.

- Wang, D; Shi, J; Carlson, S; Cregan,P; Ward, R; Diers, B. 2003. **A low-cost, high-throughput polyacrylamide gel electrophoresis system for genotyping with microsatellite DNA markers.** Crop Science. 43: 1828-1832.
- Watanabe,A; Widyatmoko, A; Rimbawanto, A; Shiraish, i S, 2004. **Discrimination of teak (*Tectona grandis*) plus trees using selected random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers.** Journal of Tropical Forest Science 16: 17-24.
- Weaver, P. 1993. ***Tectona grandis***. L.f Teak. SO-ITF-SM-64. New Orleans, LA: US. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experimental Station. 18 p.
- Weising, K; Kahl, G. 1997. **Hybridization-based microsatellite fingerprinting of plants and fungi.** In: DNA Markers: Protocols, Applications and Overviews. Edited by: Caetano-Anollés, G; Gresshoff, P. Ed. Wiley-Liss, Inc. USA. Pp: 27-30.
- Yáñez, V. 2002. **Aislamiento y Caracterización de Marcadores Moleculares Microsatélites a partir de la Construcción de Librerías Genómicas Enriquecidas de Camote (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.)** Tesis para optar por el Título Profesional de Biólogo con Mención en Genética. Universidad Nacional Mayor de San Carlos. Lima, Perú. Pp: 12-19.
- Zane, I; Bargelloni, L; Patarnello, T; 2002. **Strategies for microsatellite isolation: a review.** Molecular Ecology 11. Pp: 1-16.

Apéndice 2. Resultados de cuantificación de ADN y proteínas en muestras de *T. grandis*.

| Muestra | Mediciones en el cuantificador | | | | | Espectrofotómetro | | | |
|---------|--------------------------------|--------|--------|--------|---------|-------------------|------------------|-------|------------|
| | 260nm | 280nm | 320nm | 230nm | 260/280 | ADN (ng/uL) | Proteína (mg/ml) | 260nm | ADN(ng/uL) |
| 1.1 | 0.019 | 0.011 | 0.004 | 0.020 | 1.72 | 9.3 | 0.0 | 0.018 | 90 |
| 1.2 | 0.011 | 0.009 | 0.007 | 0.018 | 1.13 | 5.3 | 0.1 | 0.010 | 50 |
| 1.3 | 0.018 | 0.010 | 0.002 | 0.014 | 1.74 | 9.1 | 0.0 | 0.017 | 85 |
| 2.1 | 0.099 | 0.060 | 0.010 | 0.058 | 1.66 | 49.3 | 0.2 | 0.087 | 435 |
| 2.2 | 0.008 | 0.005 | 0.002 | 0.012 | 1.54 | 3.9 | 0.0 | 0.004 | 20 |
| 2.3 | 0.009 | 0.007 | 0.004 | 0.014 | 1.34 | 4.7 | 0.0 | 0.008 | 40 |
| 3.1 | 0.032 | 0.017 | 0.002 | 0.023 | 1.82 | 15.9 | 0.0 | 0.032 | 160 |
| 3.2 | 0.009 | 0.009 | 0.004 | 0.013 | 1.03 | 4.5 | 0.1 | 0.008 | 40 |
| 3.3 | 0.011 | 0.007 | 0.005 | 0.014 | 1.45 | 5.4 | 0.0 | 0.011 | 55 |
| 4.1 | 0.026 | 0.016 | 0.004 | 0.020 | 1.62 | 13.2 | 0.1 | 0.025 | 125 |
| 4.2 | 0.042 | 0.026 | 0.002 | 0.028 | 1.65 | 21.0 | 0.1 | 0.042 | 210 |
| 4.3 | 0.039 | 0.022 | 0.002 | 0.027 | 1.75 | 19.7 | 0.0 | 0.040 | 200 |
| 5.1 | 0.054 | 0.032 | 0.006 | 0.040 | 1.68 | 26.8 | 0.1 | 0.054 | 270 |
| 5.2 | 0.058 | 0.034 | 0.001 | 0.034 | 1.70 | 28.8 | 0.1 | 0.058 | 290 |
| 5.3 | 0.022 | 0.013 | 0.002 | 0.021 | 1.71 | 10.9 | 0.0 | 0.022 | 110 |
| 6.1 | 0.014 | 0.011 | 0.008 | 0.021 | 1.28 | 6.9 | 0.1 | 0.011 | 55 |
| 6.2 | 0.035 | 0.023 | 0.009 | 0.033 | 1.57 | 17.5 | 0.1 | 0.031 | 155 |
| 6.3 | 0.012 | 0.007 | 0.002 | 0.015 | 1.89 | 6.2 | 0.0 | 0.013 | 65 |
| 7.1 | 0.014 | 0.007 | 0.001 | 0.013 | 2.01 | 7.1 | 0.0 | 0.016 | 80 |
| 7.2 | 0.010 | -0.003 | 0.002 | 0.011 | -3.01 | 5.1 | 0.0 | 0.009 | 45 |
| 7.3 | 0.016 | -0.010 | -0.011 | -0.002 | -1.65 | 8.0 | 0.0 | 0.009 | 45 |
| 8.1 | 0.034 | 0.022 | -0.007 | 0.019 | 1.55 | 17.1 | 0.1 | 0.032 | 160 |

| | | | | | | | | | |
|------|-------|--------|--------|-------|--------|------|-----|-------|-----|
| 8.2 | 0.008 | 0.006 | 0.002 | 0.045 | 1.24 | 3.8 | 0.0 | 0.007 | 35 |
| 8.3 | 0.007 | 0.005 | 0.003 | 0.011 | 1.33 | 3.4 | 0.0 | 0.066 | 330 |
| 9.1 | 0.008 | 0.005 | -0.003 | 0.019 | 1.64 | 3.8 | 0.0 | 0.005 | 25 |
| 9.2 | 0.003 | 0.002 | -0.001 | 0.002 | 1.82 | 1.5 | 0.0 | 0.017 | 85 |
| 9.3 | 0.006 | 0.004 | 0.003 | 0.019 | 1.42 | 2.8 | 0.0 | 0.005 | 25 |
| 10.1 | 0.013 | 0.009 | 0.001 | 0.015 | 1.36 | 6.3 | 0.0 | 0.015 | 75 |
| 10.2 | 0.005 | 0.003 | 0.005 | 0.019 | 1.50 | 2.5 | 0.0 | 0.004 | 20 |
| 10.3 | 0.018 | 0.007 | -0.002 | 0.012 | 2.55 | 8.8 | 0.0 | 0.007 | 35 |
| 11.1 | 0.010 | 0.007 | 0.003 | 0.024 | 1.37 | 5.1 | 0.0 | 0.010 | 50 |
| 11.2 | 0.004 | 0.000 | -0.001 | 0.019 | 9.66 | 2.1 | 0.0 | 0.005 | 25 |
| 11.3 | 0.001 | 0.000 | -0.001 | 0.002 | 3.54 | 0.7 | 0.0 | 0.003 | 15 |
| 12.1 | 0.026 | 0.015 | 0.006 | 0.028 | 1.74 | 13.0 | 0.0 | 0.021 | 105 |
| 12.2 | 0.014 | 0.000 | 0.000 | 0.021 | -74.23 | 6.9 | 0.0 | 0.001 | 5 |
| 12.3 | 0.019 | 0.004 | -0.004 | 0.022 | 4.49 | 9.5 | 0.0 | 0.008 | 40 |
| 13.1 | 0.014 | 0.000 | 0.000 | 0.021 | -53.06 | 7.0 | 0.0 | 0.006 | 30 |
| 13.2 | 0.014 | 0.006 | -0.003 | 0.040 | 2.23 | 7.0 | 0.0 | 0.006 | 30 |
| 13.3 | 0.022 | 0.015 | 0.004 | 0.026 | 1.50 | 10.9 | 0.1 | 0.022 | 110 |
| 14.1 | 0.040 | 0.056 | 0.000 | 0.031 | 0.72 | 20.1 | 0.6 | 0.036 | 180 |
| 14.2 | 0.011 | -0.002 | -0.001 | 0.018 | -4.49 | 5.6 | 0.0 | 0.002 | 10 |
| 14.3 | 0.009 | 0.006 | 0.002 | 0.014 | 1.57 | 4.5 | 0.0 | 0.010 | 50 |
| 15.1 | 0.011 | -0.005 | -0.002 | 0.017 | -3.52 | 5.3 | 0.0 | 0.004 | 20 |
| 15.2 | 0.029 | 0.018 | 0.000 | 0.019 | 1.68 | 14.7 | 0.0 | 0.026 | 130 |
| 15.3 | 0.008 | 0.008 | 0.007 | 0.013 | 1.03 | 4.1 | 0.1 | 0.014 | 70 |
| 19.1 | 0.002 | 0.001 | 0.000 | 0.002 | 2.30 | 1.0 | 0.0 | 0.013 | 65 |
| 19.2 | 0.006 | 0.005 | 0.005 | 0.009 | 1.10 | 2.8 | 0.0 | 0.003 | 15 |
| 19.3 | 0.005 | 0.005 | 0.004 | 0.008 | 1.13 | 2.7 | 0.0 | 0.001 | 5 |
| 20.1 | 0.005 | 0.005 | 0.003 | 0.010 | 1.19 | 2.7 | 0.0 | 0.009 | 45 |
| 20.2 | 0.008 | 0.007 | 0.005 | 0.013 | 1.16 | 4.1 | 0.0 | 0.004 | 20 |
| 20.3 | 0.009 | 0.007 | 0.004 | 0.013 | 1.33 | 4.5 | 0.0 | 0.010 | 50 |
| 21.1 | 0.011 | 0.006 | 0.001 | 0.011 | 1.66 | 5.3 | 0.0 | 0.008 | 40 |
| 21.2 | 0.006 | 0.006 | 0.004 | 0.011 | 1.10 | 3.1 | 0.0 | 0.003 | 15 |
| 21.3 | 0.005 | 0.003 | 0.002 | 0.008 | 1.42 | 2.4 | 0.0 | 0.002 | 10 |
| 22.1 | 0.007 | 0.004 | 0.001 | 0.008 | 1.56 | 3.3 | 0.0 | 0.008 | 40 |

| | | | | | | | | | |
|----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| 22.2 | 0.002 | 0.002 | 0.001 | 0.002 | 1.16 | 1.1 | 0.0 | 0.002 | 10 |
| 22.3 | 0.005 | 0.005 | 0.004 | 0.009 | 1.10 | 2.7 | 0.0 | 0.002 | 10 |
| 23.1 | 0.008 | 0.007 | 0.005 | 0.014 | 1.24 | 4.2 | 0.0 | 0.005 | 25 |
| 23.2 | 0.014 | 0.012 | 0.012 | 0.019 | 1.13 | 6.8 | 0.1 | 0.001 | 5 |
| 23.3 | 0.009 | 0.007 | 0.004 | 0.015 | 1.22 | 4.4 | 0.0 | 0.004 | 20 |
| 24.1 | 0.004 | 0.003 | 0.001 | 0.010 | 1.31 | 2.0 | 0.0 | 0.005 | 25 |
| 24.2 | 0.003 | 0.002 | 0.001 | 0.002 | 1.19 | 1.3 | 0.0 | 0.022 | 110 |
| 24.3 | 0.007 | 0.005 | 0.004 | 0.013 | 1.25 | 3.3 | 0.0 | 0.006 | 30 |
| 25.1 | 0.005 | 0.004 | 0.003 | 0.011 | 1.07 | 2.4 | 0.0 | 0.018 | 90 |
| 25.2 | 0.009 | 0.006 | 0.002 | 0.013 | 1.48 | 4.7 | 0.0 | 0.010 | 50 |
| 25.3 | 0.005 | 0.004 | 0.001 | 0.011 | 1.30 | 2.5 | 0.0 | 0.006 | 30 |
| 27.1 | 0.003 | 0.002 | 0.001 | 0.002 | 1.15 | 1.4 | 0.0 | 0.015 | 75 |
| 27.2 | 0.005 | 0.004 | 0.001 | 0.010 | 1.28 | 2.3 | 0.0 | 0.007 | 35 |
| 27.3 | 0.003 | 0.003 | 0.001 | 0.010 | 1.19 | 1.6 | 0.0 | 0.006 | 30 |
| 28.1 | 0.005 | 0.003 | 0.002 | 0.009 | 1.40 | 2.3 | 0.0 | 0.047 | 235 |
| 28.2 | 0.009 | 0.007 | 0.004 | 0.013 | 1.27 | 4.5 | 0.0 | 0.041 | 205 |
| 28.3 | 0.006 | 0.005 | 0.002 | 0.011 | 1.19 | 3.0 | 0.0 | 0.006 | 30 |
| 29.1 | 0.002 | 0.002 | 0.001 | 0.002 | 1.25 | 1.2 | 0.0 | 0.003 | 15 |
| 29.2 | 0.003 | 0.003 | 0.001 | 0.009 | 1.19 | 1.7 | 0.0 | 0.006 | 30 |
| 29.3 | 0.004 | 0.004 | 0.003 | 0.010 | 1.03 | 2.0 | 0.0 | 0.007 | 35 |
| 33.1 | 0.001 | 0.001 | 0.000 | 0.002 | 0.99 | 0.7 | 0.0 | 0.003 | 15 |
| 33.2 | 0.015 | 0.017 | 0.018 | 0.018 | 0.90 | 7.5 | 0.1 | 0.013 | 65 |
| 33.3 | 0.004 | 0.003 | 0.001 | 0.009 | 1.11 | 1.8 | 0.0 | 0.008 | 40 |
| 35.1 | 0.009 | 0.008 | 0.006 | 0.013 | 1.23 | 4.6 | 0.0 | 0.011 | 55 |
| 35.2 | 0.008 | 0.007 | 0.004 | 0.013 | 1.19 | 4.0 | 0.0 | 0.014 | 70 |
| 35.3 | 0.006 | 0.004 | 0.001 | 0.010 | 1.41 | 3.0 | 0.0 | 0.007 | 35 |
| | | | | | | | | | |
| Promedio | 0.01 | 0.01 | 0.00 | 0.02 | -0.25 | 6.84 | 0.03 | 0.01 | 73.64 |
| Desviación Estándar | 0.02 | 0.01 | 0.00 | 0.01 | 10.39 | 7.53 | 0.08 | 0.02 | 79.99 |

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica, 2006

