

Instituto Tecnológico de Costa Rica

Escuela de Biología



VALIDACIÓN DEL PROTOCOLO AFLP PARA CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GENÉTICA EN *Dipteryx panamensis* (Pitt.) (FABACEAE)

Trabajo Final de Graduación realizado para optar por el título de Ingeniera en
Biotecnología con grado académico de bachiller universitario

Natalia Meza Ramírez

Cartago, Enero 2010

Validación del protocolo AFLP para Caracterización Molecular y Análisis de Diversidad Genética en *Dipteryx panamensis* (Pitt.) (Fabaceae)

Natalia Meza Ramírez*

RESUMEN

Los marcadores moleculares son una herramienta muy útil para apoyar los criterios de selección de material en programas de mejoramiento genético. Previo a su aplicación, es necesario estandarizar los protocolos de caracterización molecular de individuos. Por lo tanto, el presente estudio tuvo por objetivo validar la metodología AFLP para su uso en conservación y mejoramiento genético de *Dipteryx panamensis* (almendro amarillo).

Se trabajó con dos grupos de árboles seleccionados provenientes de progenies de poblaciones naturales de *D. panamensis* ubicadas en la Zona Norte de Costa Rica, cuyos individuos emparentados se agruparon por familia. Seis combinaciones de imprimadores AFLP fueron seleccionadas (E-AC/M-CTG, E-AAT/M-CTG, E-ACA/M-CTG, E-ACC/M-CTG, E-AGC/M-CTG y E-ATC/M-CTG) las cuales permitieron el análisis de 242 *loci*. En promedio, para cada familia se observó un índice de diversidad de Nei de 0,120 y PLP de 33%, siendo la Familia 1 el grupo más diverso. El análisis AMOVA mostró que la varianza genética se distribuye en mayor proporción a nivel de individuos (69%).

Basados en las distancias genéticas de Nei (1978), se realizaron análisis de agrupamiento NJ, UPGMA y PCA. Lo anterior permitió visualizar conjuntos de individuos con mayor cercanía genética entre sí y reconstruir por tanto las relaciones de parentesco dentro y entre familias. Esto garantiza que la implementación del protocolo AFLP en *Dipteryx panamensis* permite obtener resultados fiables respecto a la diversidad y similitud genética y puede ser aplicado en estudios posteriores.

DESCRIPTORES: *Dipteryx panamensis*, Fabaceae, almendro amarillo, AFLP, diversidad genética, caracterización molecular, poblaciones, fitomejoramiento.

*INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACION. Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2010

AFLP protocol validation: molecular characterization and genetic diversity analysis in *Dipteryx panamensis* (Pitt.) (Fabaceae)

Natalia Meza Ramírez*

ABSTRACT

Molecular markers are useful tool to support selection criteria in breeding programs. Before applying in molecular characterization of individuals, protocol requires a standardization process. Therefore, this study aims to validate AFLP method for use in conservation and breeding activities in *Dipteryx panamensis* (tonka bean tree).

Two main groups selected from progeny in natural population of *D.panamensis* in Zona Norte of Costa Rica were sampled. Individuals related were grouped in families. Six AFLP primer combinations were selected (E-AC/M-CTG, E-AAT/M-CTG, E-ACA/M-CTG, E-ACC/M-CTG, E-AGC/M-CTG y E-ATC/M-CTG), and a total of 242 *loci* were analyzed. In average, each family presented a Nei's diversity index of 0,120 and 33% PLP, and Family 1 was the most diverse group. AMOVA analysis indicated the main genetic variation was among individuals (69%).

Based on Nei's genetic distances (1978) UPGMA, NJ and PCA cluster analysis have been realized. AFLP data were used to construct dendrograms among and within families, and to meet kinship relations. In conclusion, use of AFLP protocol in *Dipteryx panamensis*, allowed reliable results genetic diversity and distance, and can applied in future research.

KEYWORDS: *Dipteryx panamensis*, Fabaceae, AFLP, genetic diversity, molecular characterization, population, breeding plant

*GRADUATION PROJECT REPORT. Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2010

**VALIDACIÓN DEL PROTOCOLO AFLP PARA
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS DE DIVERSIDAD
GENÉTICA EN *Dipteryx panamensis* (Pitt.) (FABACEAE)**

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 del Tribunal

Ingeniero Olman Murillo Gamboa, Ph.D.

Asesor ITCR

Biólogo Federico Albertazzi Castro, Dr.rer.nat.

Asesor CIBCM

Ingeniera Fabiana Rojas Parales, Bach.

Lectora

DEDICATORIA

*A Dios, quien siempre me acompaña
A mis padres, por apoyarme incondicionalmente
en cada momento de mi vida
y a Cristián por ser mi eterna motivación*

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación se llevó a cabo gracias al aporte financiero del proyecto “Mejoramiento y conservación genética de especies forestales amenazadas y de importancia económica asistido con marcadores genéticos” No. 801-A9-511 adscrito a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica (UCR), al Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR) y a la Universidad Estatal a Distancia (UNED), apoyado por el Fondo Estatal de Educación Superior (FEES).

El presente documento es parte del trabajo interinstitucional llevado a cabo por el personal del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM) de la UCR y el Centro de Investigación e Integración Bosque e Industria (CIIBI) del ITCR, y por tanto quisiera agradecer a las personas que colaboraron de una manera u otra en la ejecución del proyecto.

Asimismo, quisiera agradecer muy especialmente al Dr. Federico Albertazzi, a la M.Sc. Heidy Villalobos y al Dr. Olman Murillo, por permitirme trabajar y aprender junto a ustedes, por su valiosa guía y consejos. De igual manera, le debo dar las gracias al M.Sc Johnny Peraza, mi mentor y guía durante mis años de estudio.

A la Ing. Fabiana Rojas y a la Ing. Yorlenny Badilla, investigadoras del CIIBI, les agradezco todos sus aportes, colaboración y recomendaciones.

Finalmente, pero no menos importante, le agradezco a mi familia, amigos y colegas por el apoyo, la paciencia y comprensión a lo largo de toda la carrera.

TABLA DE CONTENIDOS

Resumen	ii
Abstract	iii
Acreditación	iv
Dedicatoria	v
Agradecimientos	vi
Índice de cuadros.....	ix
Índice de figuras	x
Índice de anexos	xi
Introducción	1
Revisión de Literatura	4
Descripción general de la especie.....	4
Taxonomía	4
Descripción botánica	5
Distribución y hábitat	8
Condiciones de crecimiento en vivero y plantación.....	8
Características y usos de la madera	9
Marcadores Genéticos	9
Generalidades	9
Marcadores basados en ADN	10
AFLP: Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados	11
Ventajas y desventajas del uso de AFLP.....	12
Aplicación de marcadores moleculares en especies forestales.....	13
Objetivos	15
Objetivo general	15
Objetivos específicos.....	15
Materiales y Métodos.....	16

Obtención de tejido vegetal.....	16
Extracción de ADN a partir de tejido foliar de <i>D. panamensis</i>	16
Optimización del protocolo AFLP	18
Preparación del ADN.....	18
Digestión y ligación del ADN genómico	18
Amplificación Pre-Selectiva.....	20
Amplificación selectiva: Tamizaje de imprimadores	20
Implementación del protocolo AFLP	23
Análisis de datos.....	24
Resultados	25
Extracción de ADN a partir de tejido foliar de <i>D. panamensis</i>	25
Optimización del protocolo AFLP	26
Preparación de ADN	26
Amplificación selectiva: Tamizaje de imprimadores.....	26
Implementación del protocolo AFLP	29
Análisis de datos.....	29
Diversidad genética.....	29
Distancia genética	31
Análisis de varianza molecular (AMOVA).....	31
Análisis de agrupamiento	32
Discusión.....	35
Conclusiones	41
Recomendaciones.....	42
Referencias bibliográficas	43
Anexos.....	49

ÍNDICE DE CUADROS

Número	Título	Página
1	Secuencia de adaptadores e imprimadores empleados en la preparación del ADN para el análisis AFLP en <i>D. panamensis</i> .	19
2	Perfil térmico amplificación pre-selectiva de AFLP.	20
3	Imprimadores selectivos evaluados para el análisis AFLP en <i>D. panamensis</i> .	21
4	Perfil térmico para la amplificación selectiva de AFLP en <i>D. panamensis</i> .	22
5	Combinaciones de imprimadores seleccionadas para análisis AFLP en <i>D. panamensis</i> provenientes de la Zona Norte de Costa Rica.	23
6	Resultados del tamizaje de imprimadores para AFLP en <i>D. panamensis</i> provenientes de la Zona Norte de Costa Rica.	27
7	Cantidad de bandas obtenidas por cada combinación seleccionada para AFLP en <i>D. panamensis</i> proveniente de la Zona Norte de Costa Rica.	29
8	Parámetros de diversidad genética para seis familias seleccionados de <i>D. panamensis</i> provenientes de la población Los Almendros, San Carlos de Costa Rica.	30
9	Parámetros de diversidad genética para grupos descendientes de dos poblaciones naturales de <i>D. panamensis</i> de la Zona Norte de Costa Rica.	30
10	Matriz de distancia genética según Nei (1978) para seis familias provenientes de Los Almendros, San Carlos Costa Rica	31
11	Análisis de varianza molecular (AMOVA) para progenies de dos poblaciones de <i>D. panamensis</i> de la Zona Norte de Costa Rica, basado en marcadores AFLP	31
12	Código de numeración para el manejo de muestras por familia	49
13	Diluciones de ADN de <i>D. panamensis</i> realizadas para alcanzar una concentración entre 300-500 ng en cada muestra. Volumen final de 10 μ l.	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Número	Título	Página
1	Aspectos botánicos de <i>Dipteryx panamensis</i>	6
2	Aspectos botánicos reproductivos de <i>D. panamensis</i>	7
3	Sitios de corte de las enzimas de restricción utilizadas, estructura de los adaptadores, imprimador-M e imprimador-E.	19
4	Evaluación de la extracción de ADN en gel de agarosa 0,8%. Muestras obtenidas del tejido foliar de <i>D. panamensis</i> de la Zona Norte de Costa Rica.	25
5	Evaluación de la amplificación pre-selectiva en gel de agarosa 0.8% para las muestras 1-2, 1-4, 2-2, 2-4, 3-2, 3-3, 5-1, 5-2, 7-1 y 7-3.	26
6	Combinaciones de imprimadores seleccionados para el análisis AFLP en geles PAGE 6%/ 7M urea en <i>Dipteryx panamensis</i>	28
7	Dendrograma NJ generado mediante marcadores AFLP en <i>D. panamensis</i> proveniente de la Zona Norte de Costa Rica. Los datos resaltados en rojo representan los valores de agrupamiento con remuestreo.	32
8	Dendrograma UPGMA basado en distancia genética de Nei (1978) para las seis familias de <i>D. panamensis</i> de la población Los Almendros. Aguas Zarcas de San Carlos, Costa Rica.	33
9	Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) para progenies seleccionadas de <i>D. panamensis</i> provenientes de San Carlos, Costa Rica. Datos generados a partir de la distancia genética de Nei (1978) entre individuos.	34
10	Dendrograma UPGMA para 60 individuos de <i>D. panamensis</i> seleccionados de la progenie de poblaciones naturales de la Zona Norte de Costa Rica	51
11	Dendrograma NJ basado en distancia genética de Nei (1978) para las seis familias de <i>D. panamensis</i> de la población Los Almendros. San Carlos, Costa Rica.	52

ÍNDICE DE ANEXOS

Número	Título	Página
1	Código de numeración para identificación de muestras	49
2	Concentración inicial de ADN de <i>D.panamensis</i> para AFLP	50
3	Análisis complementarios de agrupamiento genético	51

1. INTRODUCCIÓN

El almendro amarillo (*Dipteryx panamensis* (Pittier) Record & Mell; Fabaceae, Papilionoideae) es una especie forestal, endémica de la zona Atlántica de países como Panamá, Nicaragua y Colombia, además de la Zona Norte y Caribe costarricense. Se trata de una especie muy apreciada por la calidad de su madera, potencial ornamental, y por su valor ecológico, ya que proporciona alimento a gran cantidad de especies animales, entre ellos insectos, mamíferos y aves (Chaverri, 1996). *D. panamensis* puede alcanzar alturas de hasta 60 m, por lo que ha sido aprovechado por la lapa verde (*Ara ambigua*) para anidar a salvo en los huecos dejados por las ramas secas en árboles sobremaduros. Éstas características convierten a *D. panamensis* en una especie de suma importancia para la conservación de la fauna en vías de extinción y en la promoción de programas de reforestación (Chaves, 2001).

Históricamente, los bosques naturales han constituido la principal fuente de materia prima para la explotación de madera a nivel comercial e industrial; sin embargo, el avance de la deforestación en las últimas décadas ha motivado los esfuerzos para el establecimiento de plantaciones forestales. Su propósito es proporcionar productos maderables, además de brindar una serie de beneficios ambientales como protección del suelo y mantos acuíferos, mitigación de gases de efecto invernadero, acumulación de carbono y favorecer también el proceso de regeneración de bosques naturales (Montagnini, 2004).

En Costa Rica, el cultivo de madera con miras a la producción comercial ha tomado fuerza, y ha logrado atraer una importante inversión nacional y extranjera, alcanzando así una exitosa inserción en la economía nacional. De acuerdo a datos del Fondo Nacional de Financiamiento Forestal, la actividad maderera representa cerca del 8% del producto interno bruto (PIB) nacional (FONAFIFO, 2003). Sin embargo, los niveles de productividad reportado para las plantaciones costarricenses no son del todo satisfactorios (Murillo *et al.* 2008).

Para lograr el aumento del rendimiento productivo uno de los elementos claves es, sin duda, la inversión en ciencia y tecnología aplicada específicamente en programas de mejoramiento genético. Bajo ésta perspectiva, el MINAET (Ministerio Nacional de Ambiente, Energía y Telecomunicaciones) ha identificado como prioridad nacional el estímulo y

aumento del establecimiento de plantaciones forestales, así como el desarrollo de fuentes semilleras de alta calidad genética. Para cumplir con dichos objetivos, es necesario invertir en programas nacionales que contribuyan al rescate, conservación y selección de material élite a nivel de campo (Murillo *et al.* 2008).

Actualmente, GENFORES (Cooperativa de Mejoramiento Genético Forestal) trabaja a nivel nacional con programas de mejoramiento genético de especies endémicas los cuales incluyen a *Dipteryx panamensis* (Murillo *et al.* 2009). No obstante, estos programas basados en métodos tradicionales, requieren de plazos de evaluación y verificación del material seleccionado (árboles *plus*) de al menos medio ciclo de rotación del cultivo. Esto implica que los avances en especies forestales requieren de ensayos de progenie de no menos de 8 a 10 años. Además, la implementación de los ensayos se basa exclusivamente en la expresión fenotípica del individuo, por lo tanto, es posible que individuos heterocigotos con alto rendimiento a nivel de campo, pero portadores de alelos indeseables, continúen en la población. En consecuencia, se provoca un error en la selección y un evidente atraso en la búsqueda de resultados favorables, convirtiéndose en una de las principales causas de la disminución en las ganancias genéticas esperadas (Araya *et al.* 2003). Por ésta razón, el seguimiento de los programas de mejoramiento mediante marcadores moleculares, se convierte en una herramienta útil y complementaria para apoyar los criterios de selección de material élite.

En el caso de las especies forestales, el uso de marcadores moleculares, combinado con los ensayos de progenie, ha aumentado la eficiencia de diversos programas. Lo anterior ha permitido obtener resultados más rápidos y precisos en la selección de caracteres complejos, como la tasa de crecimiento y calidad de la madera producida (Araya *et al.* 2003). Además, el empleo de diversos marcadores genéticos es aplicable al tema de control de calidad, así como para la identificación y monitoreo de clones a través del establecimiento de una “huella genética” basada en el ADN (Haines, 1994).

Sin embargo, previo a la aplicación de las técnicas moleculares y su vinculación con los objetivos finales en los programas de mejoramiento, es necesaria la validación de los protocolos a emplear, de manera que los resultados obtenidos al evaluar una especie con un

marcador determinado sean reproducibles. La metodología de análisis de los polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP del inglés “Amplified Fragment Length Polymorphism”) es una de las estrategias más usadas al buscar posibles marcadores moleculares. Su principal ventaja radica en que puede aplicarse a especies cuya secuencia del genoma aún se desconoce, como es el caso de *Dipteryx panamensis*. Igualmente, proporciona una aproximación de la variación en todo el genoma. Para su implementación, lo primordial es optimizar el protocolo a través de un tamizaje de los imprimadores idóneos para cada especie a trabajar. Los resultados obtenidos a través de la metodología AFLP son lo suficientemente polimórficos como para obtener huellas genéticas de individuos y por lo tanto, realizar análisis de diversidad genética en poblaciones.

En *D. panamensis* se ha reportado el uso de microsatélites (conocidos también como SSR del inglés “Simple Sequences Repeat”) desarrollados en Brasil para la especie *Dipteryx odorata*. En el almendro amarillo, dichas secuencias han sido empleadas para el estudio de los efectos producidos en la ecología reproductiva de poblaciones fragmentadas presentes en bosques naturales de Costa Rica (Hanson, 2006). Sin embargo, en la ejecución de los programas de mejoramiento, es necesario contar con diferentes técnicas que permitan identificar verdaderos alelos los cuales puedan correlacionarse con las características de interés observadas en los árboles *plus*. Es por ésta razón que el presente proyecto pretende validar la metodología de análisis genético en almendro amarillo (*Dipteryx panamensis*), con la finalidad de utilizar los protocolos para el seguimiento de programas de mejoramiento genético tradicionales desarrollados a nivel nacional y para el monitoreo de las poblaciones propias de la Zona Norte de Costa Rica. El proyecto se enmarca dentro de la iniciativa del FEES (Fondo Estatal para la Educación Superior) titulada “Mejoramiento y conservación genética de especies forestales amenazadas y de importancia económica asistido con marcadores genéticos” y desarrollada por profesionales del Instituto Tecnológico de Costa Rica, Universidad de Costa Rica y Universidad Estatal a Distancia.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

Dipteryx panamensis (Pittier) Record & Mell es uno de los árboles más llamativos del bosque tropical húmedo y muy húmedo costarricense. Es considerada una especie clave para el rescate y conservación de los recursos naturales, debido particularmente a su abundante producción de frutos, los cuales son parte de la dieta de varios grupos de organismos y representan por tanto, una fuerte influencia en los diferentes niveles tróficos del ecosistema (Hanson *et al.* 2007).

Anteriormente, *D. panamensis* podía observarse como un habitante remanente de bosques y potreros, sin embargo la alta deforestación que se ha dado en la Zona Norte de Costa Rica, ha dejado menos del 30% del bosque en pie, lo que provoca una fragmentación de la cobertura original. En la actualidad, el aprovechamiento de los árboles de almendro amarillo se encuentra restringido mediante el decreto Decreto Ejecutivo No. 25167, ya que se trata de un recurso importante para la anidación y alimentación de la lapa verde (*Ara ambigua*), especie en vías de extinción de acuerdo al Apéndice I de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre (CITES, 2009).

2.1 Descripción general de la especie

2.1.1 Taxonomía

Familia:	Fabaceae
Sub-Familia:	Papilionaceae
Nombre científico:	<i>Dipteryx panamensis</i> (Pittier) Record & Mell
Sinonimia:	<i>Coumarouna panamensis</i> (Pittier) <i>Dipteryx oleifera</i> (Benth) <i>Dipteryx oleiforma</i> (Benth) <i>Oleiocarpus panamensis</i> (Pittier) Dwyer <i>Oleiocarpon panamensis</i> (Pittier) Dwyer

Nombres comunes: Almendro amarillo, Almendro, Almendrón, Almendro de montaña, Tonka bean tree, Eboe (lengua Bribri) (Piotto, 2001).

2.1.2 Descripción botánica

- a. **Árbol:** el almendro amarillo es un árbol de crecimiento lento y emergente del dosel superior. Su fuste es cilíndrico, liso y recto, los adultos rondan los 20-60 m de altura, y 50-200cm de diámetro (Condit y Pérez, 2008). La corteza es suave de color marrón rojizo o marrón amarillento, con lenticelas verticales. Su albura presenta un color amarillento, y la transición hacia el duramen (con coloración más rojiza) es difícil de detectar, lo que hace a esta madera aún más atractiva (Rodríguez, 2009).
- b. **Hojas:** Posee hojas compuestas imparipinnadas, alternas y multifoliadas que presentan de 10 a 20 folíolos oblongos de 3-8 cm de ancho y 7-15 cm de largo, en el haz se observa una coloración verde, mientras que en el envés se encuentran tonos blanco o grisáceos. Los folíolos son asimétricos, de ápice acuminado, base desigual, bordes enteros y superficie casi glabra (Condit y Pérez, 2008). El raquis es alado y se proyecta en una prolongación aguda más afuera de la hoja terminal (Chaverri, 1996).
- c. **Flores:** Se presentan en inflorescencias tipo panícula, terminales o laterales de 30 a 50cm de longitud, con numerosos ejes secundarios. Las flores son de color morado antes de ser polinizadas, y una vez efectuado éste fenómeno, su tonalidad cambia a rosado claro. El periodo de floración depende del inicio de la estación lluviosa, y es variable entre diferentes regiones (Arnáez y Moreira, 2001). La flor es hemafrodita, gamopétala, monocarpelar, zigomórfica con simetría anteroposterior, de estructura tubular y presenta pubescencia glandular (Fournier, 2003). Flores (1999) reporta que a pesar de poseer flor hemafrodita, *D. panamensis* es autoestéril ya que posee un mecanismo de autoincompatibilidad tipo esporofítico.
- d. **Fruto:** es seco tipo cámara, con dehiscencia tardía que ocurre al dar inicio la germinación. Posee un endocarpo grueso y duro que contiene una sola semilla. El fruto maduro es de color pardo, mide aproximadamente 6-8 cm de largo, 4-5 de ancho y 2-3 de grosor (Fournier, 2003). La maduración se da en la temporada seca, que coincide con la escasez de otros tipos de frutos comestibles en los bosques (Arnáez y Moreira, 2001). El fruto seco puede almacenarse en aserrín húmedo por al menos 3 meses.

- e. **Semilla:** el almendro posee una semilla ovalada, de 4-5 cm de largo, de producción abundante. La semilla fresca tiene un promedio entre 55-60 unidades por kilogramo, mientras que la semilla seca ronda las 300 unidades/kg. La germinación requiere de 12-20 días cuando no se ha aplicado ningún pre-tratamiento. En condiciones naturales son dispersadas por más de 60 especies de mamíferos y 100 especies de aves, entre ellos destacan: *Artibeus lituratus*, (murciélago frutero), *Dasyprocta punctata* (guatuzá), *Sciurus granatensis* (ardillas) y *Nasua narica* (pizote) (Bonaccorso *et al.* 1980).

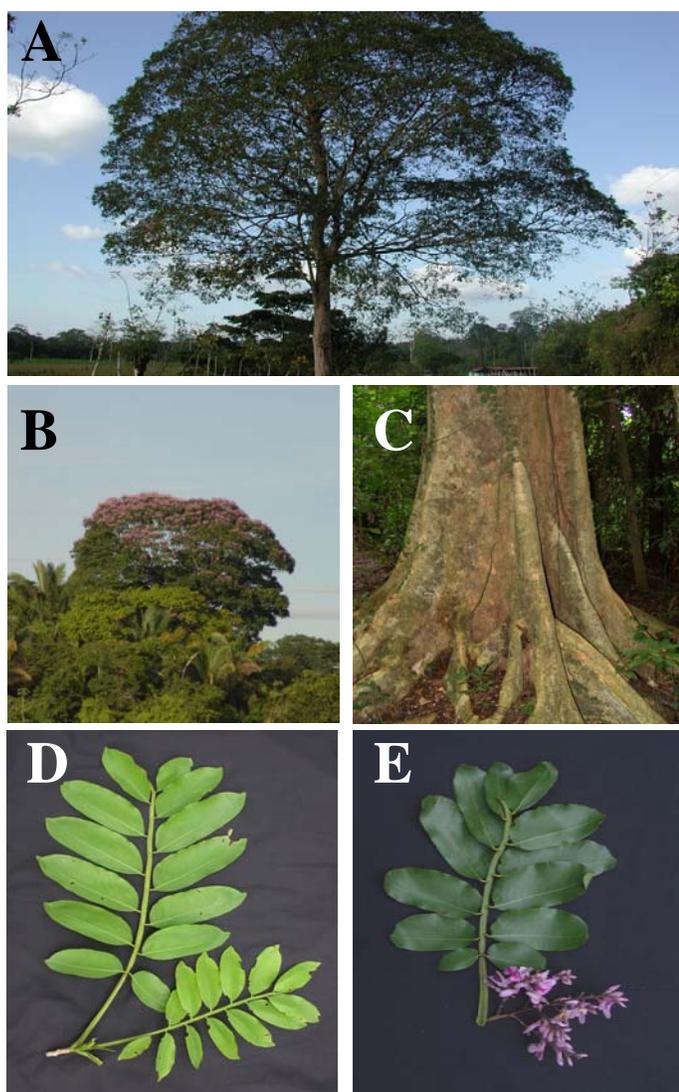


Fig 1. Aspectos botánicos de *Dipteryx panamensis*:
A. Individuo en campo abierto
B. Árbol en floración emergente de dosel superior en la zona boscosa
C. Zona basal del tronco de almendro
D. Hoja compuesta imparipinada
E. Hoja compuesta e inflorescencia

Fuente: Condit y Pérez, 2008.

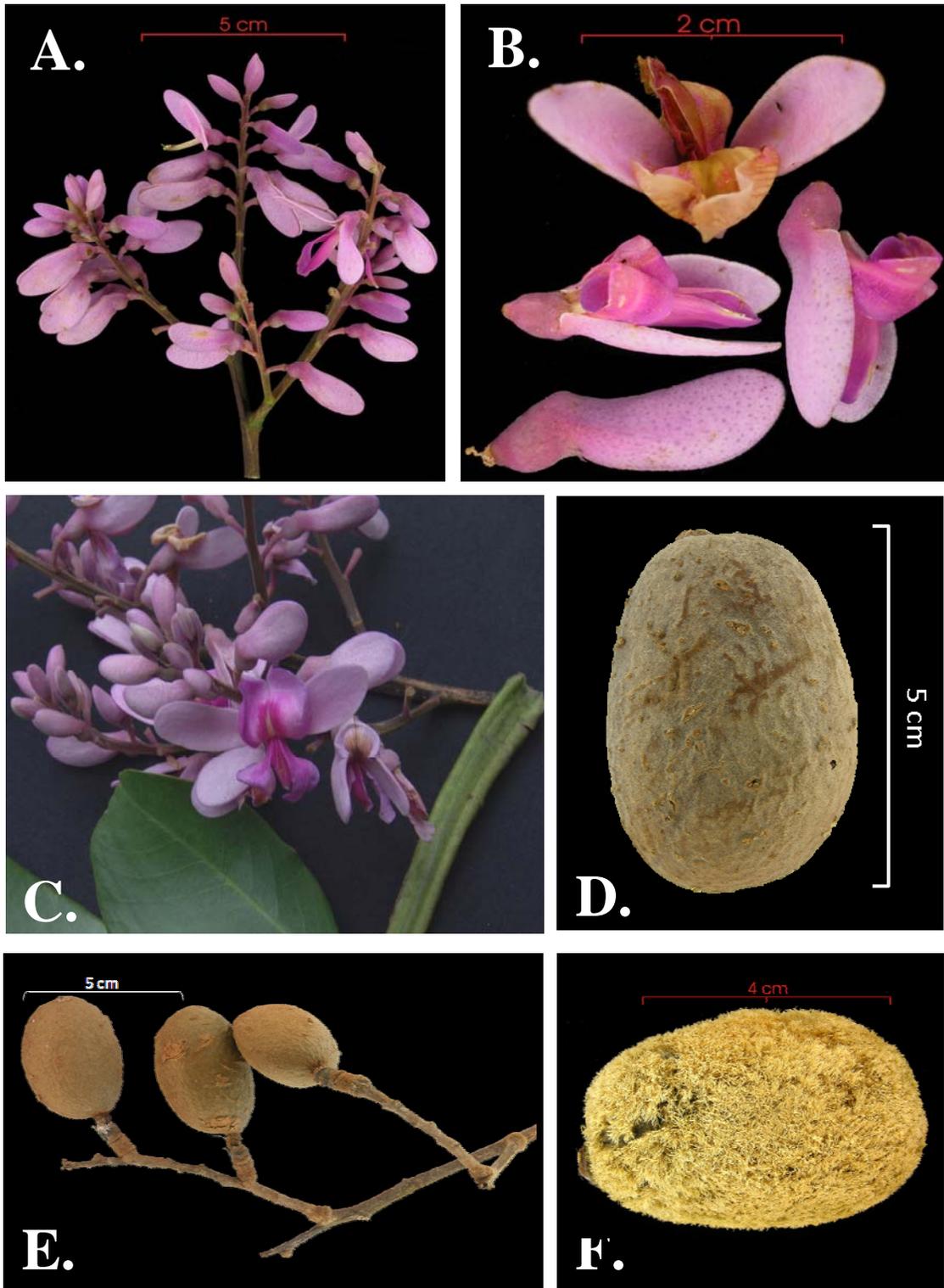


Fig 2. Aspectos botánicos reproductivos de *D. panamensis* **A. B. y C.** Inflorescencia y flores **D. y E.** Fruto y frutescencia **F.** Semilla.
Fuente: Condit y Pérez, 2008.

2.1.3 Distribución y hábitat

El almendro amarillo es una especie endémica distribuida desde Nicaragua hasta Colombia, encontrándose en las tierras bajas y planicies de la costa Caribe. En Costa Rica, además de la región Caribe, se le ubica en las llanuras de la Zona Huétar Norte. Es un árbol que habita el bosque tropical húmedo, muy húmedo y premontano húmedo, donde la temperatura media anual oscila entre 24-30°C y la precipitación media anual es de 3500 a 5500 mm. Se encuentra en planicies húmedas, con suelos aluviales o arenosos. En ocasiones puede crecer en suelos arcillosos y ácidos, en un ámbito altitudinal que varía desde los 20 a 1300 metros sobre el nivel del mar (Chaverri, 1996 y Fournier, 2003).

D. panamensis muestra una densidad de dos árboles por hectárea y su aparición dentro del bosque depende de cantidades importantes de luz. Se ha observado que la respuesta en crecimiento es mayor en claros, bordes del bosque y potreros. El ciclo reproductivo es anual: la floración puede observarse a finales de la estación seca y los frutos aún inmaduros son dispersados al comienzo de la siguiente estación seca, germinando de dos a cuatro meses después (Arnáez y Moreira, 2001).

2.1.4 Condiciones de crecimiento en vivero y plantación

La reproducción comercial del almendro amarillo es básicamente sexual. Los frutos son colectados en el campo durante la época seca y llevados al vivero, donde se someten a tratamientos básicos de limpieza y desinfección. La semilla se puede pregerminar en bancales o directamente en bolsas, dejando el pedúnculo hacia arriba para evitar que los tallos suculentos se quiebren. El trasplante definitivo a campo puede realizarse entre los dos y cuatro meses. La producción en bolsa es el método más utilizado, no obstante también se reporta el uso de pseudoestacas y plantas con raíz desnuda (Chaves, 2001).

En plantación se recomienda un distanciamiento de 3 x 3 m, ya que los arbolitos jóvenes desarrollan una copa poco densa y por tanto los espacios amplios provocan que los árboles tiendan a doblarse y desarrollen ramas bajas. Además, se han observado mejores

rendimientos en suelos aluviales, aunque las plantaciones pueden adaptarse a pendientes moderadas. De acuerdo a estudios realizados en la Zona Norte del país, el crecimiento promedio de la especie es de 1,8 m de altura y 1,7 cm de diámetro por año (Chaverri, 1996).

2.1.5 Características y usos de la madera

La madera del almendro amarillo presenta un peso específico que ronda entre 0,83 g/cm³ y 1.09 g/cm³, lo cual la convierte en una de las más pesadas a nivel mundial. Es extremadamente dura y densa, la textura es mediana y cerosa con lustre medio, el poro es visible y el grano fuertemente entrecruzado (Chaverri, 1996). En la actualidad, sus características de alta resistencia mecánica y buen comportamiento la han convertido en una especie muy apetecida por el sector industrial, lo cual ha provocado su desaparición paulatina del paisaje (Rodríguez, 2009).

De acuerdo con Chaves (2001), ésta madera posee una buena resistencia a hongos, pudrición e insectos, sin embargo, el contacto con el suelo y la humedad disminuye su vida útil. Su alta durabilidad natural y propiedades ya mencionadas, la convierten en un material ideal para construcción pesada, puentes, pisos industrializados, construcciones marinas, carrocerías, durmientes de ferrocarril, vagones, quillas de barcos, vigas, mangos para herramientas de carpintería y agricultura.

2.2 Marcadores Genéticos

2.2.1. Generalidades

Los marcadores genéticos pueden definirse como genes cuya expresión fenotípica puede detectarse fácilmente, o como segmentos de ADN con una ubicación física (*locus*) identificable y cuya herencia puede ser rastreada. Se clasifican en tres grupos: morfológicos, bioquímicos y moleculares. Los de tipo morfológico se refieren a características físicas que dependen en mucho del estado fisiológico y de la influencia ambiental, de igual manera, los

marcadores bioquímicos se relacionan con la expresión regulada de los genes y la síntesis de proteínas determinadas, como las isoenzimas, o algunos metabolitos secundarios. Finalmente, existe una gran variedad de marcadores moleculares basados en ADN, los cuáles han sido utilizados con éxito en especies forestales, debido a que son independientes del estado fenológico de los individuos de la población (Hanson *et al.* 2007).

Para que un carácter determinado sea considerado un marcador genético, debe mostrar una variación detectable entre los individuos de la población y un modo de herencia predecible según las leyes de Mendel. Un marcador ideal debe ser: altamente polimórfico, variable dentro y entre especies, inalterable debido a causas ambientales, de herencia mendeliana no epistática, codominante, de fácil identificación y posible detección en estadios fenológicos tempranos (Carrera *et al.* 2004).

2.2.2. Marcadores basados en ADN

Los marcadores moleculares se establecen a partir del análisis de las diferencias en secuencias homólogas del ADN entre individuos. Tales diferencias surgen por cambios o arreglos (translocaciones, inversiones, sustituciones, inserciones y deleciones) entre las pares de bases que constituyen las moléculas de ADN. Por tanto, la importancia de éste tipo de marcadores radica en la detección directa de variaciones que experimenta un determinado organismo a nivel de su información genética o genoma. Poseen la ventaja de que se mantienen estables y no están sometidos al ambiente en el que se desarrolla el organismo (Valadez y Kahl, 2000).

Un marcador basado en ADN es un punto de referencia en un cromosoma, y no necesariamente se trata de una región codificante. La biología molecular ha permitido el desarrollo de diversas técnicas para detectar la variabilidad en las secuencias de ADN, las cuales pueden clasificarse básicamente en dos grupos: marcadores basados en hibridación y marcadores basados en amplificación. El primero de ellos implica la detección de un segmento específico del ADN a través de la hibridación entre un fragmento marcado (sonda) y su secuencia complementaria presente en el genoma del individuo en estudio. El mejor ejemplo

de dichas técnicas es el análisis de los Polimorfismos de Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP del inglés “Restriction Fragment Length Polymorphisms”), en donde el ADN genómico es digerido por enzimas de restricción y luego de su separación mediante electroforesis, se somete a la hibridación con una sonda que emite una señal radioactiva (Carrera *et al.* 2004).

Los marcadores cuyo fundamento es la amplificación del ADN, emplean la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR del inglés “Polymerase Chain Reaction”) para obtener millones de copias de uno o varios segmentos específicos de ADN. De acuerdo a Mueller y Wolfenbarger (1999), éstas técnicas permiten generar múltiples perfiles arbitrarios de amplificación útiles para el desarrollo de huellas genéticas. Entre éstos métodos cabe destacar: ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD del inglés “Random Amplification of Polymorphic DNA”), polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP), microsatélites o secuencias simples repetitivas (SSR del inglés “Simple Sequence Repeat”), amplificación aleatoria del polimorfismos de microsatélites (RAMPO del inglés “Random Amplified Microsatellites Polymorphism”), entre otras (Azofeifa, 2006).

2.2.3. AFLP: Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados

La metodología AFLP puede considerarse como una técnica producto de la combinación de los protocolos de RFLP y PCR. Básicamente, emplea la amplificación selectiva de fragmentos generados mediante restricción enzimática. Los AFLPs permiten el análisis de un elevado número de *loci*, de manera que se obtienen marcadores moleculares precisos, sensibles y de alta eficacia sin necesidad de requerir información previa de la secuencia del genoma del individuo a trabajar (Azofeifa, 2006).

En esencia, la técnica puede resumirse en cuatro etapas: 1. el primer paso consiste en cortar el ADN con dos enzimas de restricción que permite obtener segmentos de diferentes tamaños y con extremos cohesivos, por lo general una de las enzimas es de corte frecuente (reconoce sitios de corte de 4 pb) y la otra es de corte raro o poco frecuente (sitios de corte de 6-8 pb). 2. En la siguiente etapa, los fragmentos generados se acoplan con adaptadores

(oligonucleótidos) de doble cadena que reconocen los extremos generados en la digestión. Por sí solo, la secuencia conocida de los extremos cohesivos (4-6 pb) generados en la restricción no son lo suficientemente extensos para diseñar adecuadamente imprimadores, lo que hace vital la adición de adaptadores mediante ligación. De ésta manera se logra proveer al ADN muestra de una secuencia conocida que será empleada como molde en las sucesivas etapas de amplificación. 3. Posteriormente, el ADN ligado se somete a una reacción de pre-amplificación con el fin de disminuir la cantidad de fragmentos a analizar. 4. Finalmente, se realiza una amplificación selectiva donde se dan condiciones específicas que permiten observar diferencias polimórficas entre individuos. Los resultados se evalúan por medio de una electroforesis en geles de alta resolución y se analiza el patrón de fragmentos amplificados.

El fundamento de la obtención de polimorfismos es la ausencia o presencia de segmentos de un tamaño determinado y al igual que en los RAPD no es posible distinguir individuos heterocigotos, ya que se trata de un marcador dominante (Carrera *et al.* 2004). Las diferencias observadas en los patrones de bandas generados vía AFLP pueden surgir debido a variaciones en los sitios de restricción, en la longitud de la secuencia y por cambios en la secuencia de pares de bases reconocidas por los imprimadores usados en la amplificación selectiva (Valadez y Kahl, 2000).

2.2.4. Ventajas y desventajas del uso de AFLP

La principal ventaja de la utilización de la metodología AFLP radica en que no es preciso conocer el genoma de la especie, ya que independientemente de la muestra se generan fragmentos con una secuencia que es conocida (adaptadores ligados al ADN muestra). Por tanto, no es necesario el diseño de imprimadores específicos, ni de condiciones diferenciales en el perfil térmico de reacción para cada muestra (Azofeifa, 2006).

Los AFLP permiten una exploración rápida de los polimorfismos del genoma entero, ya que se genera un gran número de bandas y con el uso de imprimadores adecuados se obtiene una huella genética sumamente informativa. Además, no requieren del uso de sondas

de hibridación, permiten generar “perfiles de transcripción” empleando ADNc (ADN generado a partir de ARN), son reproducibles y proporcionan información confiable y representativa (Carrera *et al.* 2004).

No obstante, en ocasiones la cantidad de información generada es tan grande que requiere un análisis de datos minucioso y complicado si se compara con RAPD o microsatélites. Además requiere de una mayor cantidad de ADN genómico y la información que suministra es de tipo dominante (Valadez y Kahl, 2000).

2.2.5 Aplicación de marcadores moleculares en especies forestales

En el campo de la biotecnología forestal, la utilización de marcadores moleculares ha permitido el desarrollo de herramientas complementarias a las metodologías tradicionales para la producción. Algunas de estas aplicaciones están basadas en el establecimiento de huellas genéticas para identificar individuos seleccionados en programas de mejoramiento y en la determinación de la eficiencia en huertos semilleros y en el control de calidad de los mismos. Se utilizan también para el monitoreo de la estabilidad genética en poblaciones clonales y establecimiento de la existencia de contaminación debido a la presencia de individuos no deseados (Rojas, 2005).

La información generada a partir de las huellas genéticas permite realizar análisis de variabilidad intra e inter poblacional, del grado de parentesco y la estimación de patrones migratorios, según dispersión del polen y semillas en condiciones naturales. Asimismo, facilita la determinación de las tasas de autofecundación, estudio de relaciones filogenéticas o taxonómicas, seguimiento de programas de conservación de material forestal, búsqueda de genes que determinen características cualitativas de interés y certificación de semilla genéticamente mejorada, entre otras aplicaciones (Acuña, 2005; Araya *et al.* 2005^a; Azofeiza, 2006; Hanson, 2006; Rojas, 2005 y Valadez y Kahl, 2000).

De acuerdo a Grattapaglia (2000), en el caso del análisis AFLP, su aplicación en programas de mejoramiento permite conocer los niveles de variabilidad genética propios de la población de mejora y correlacionar los datos generados con características de interés observadas en campo.

En *Dipteryx panamensis* (Pittier) Record & Mell, únicamente se ha reportado el uso de microsatélites desarrollados para su pariente *Dipteryx odorata* (Hanson *et al.* 2008^a). Éstos marcadores se emplearon para determinar el patrón migratorio del polen así como la diversidad genética de poblaciones naturales fragmentadas de *D. panamensis* de Costa Rica, a través de la implementación de los SSR para la generación de huellas genéticas. No obstante, el trabajo de Hanson (2006) es el único reporte dado hasta la fecha que emplea marcadores moleculares en estudios genéticos que involucren al almendro amarillo.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Validar el protocolo de análisis genético con marcadores AFLP en *Dipteryx panamensis* (Almendro amarillo) para uso en de programas de mejoramiento y conservación genética de esta especie.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Optimizar el protocolo de extracción de ADN de alta calidad a partir de muestras representativas de *Dipteryx panamensis*.
- Optimizar los protocolos de restricción, ligación, pre-amplificación y amplificación selectiva de marcadores AFLP en *D. panamensis*.
- Realizar el tamizaje de las combinaciones de imprimadores para su aplicación en análisis genéticos en *D. panamensis*.
- Validar el protocolo de análisis con marcadores AFLP para la identificación y caracterización de individuos seleccionados de *D. panamensis*.
- Determinar parámetros genéticos existentes en dos poblaciones de *D. panamensis* en Costa Rica.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio fue realizado en el Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM) de la Universidad de Costa Rica, ubicado en la Ciudad de la Investigación, San Pedro, Montes de Oca.

4.1 Obtención de tejido vegetal

Se trabajó con un total de 60 muestras de material foliar de *Dipteryx panamensis* proveniente de la progenie de dos poblaciones de la Zona Norte de Costa Rica: Finca Los Almendros en Santa Fe de Aguas Zarcas y Crucitas de Cutris, ambas ubicadas en el cantón de San Carlos, Alajuela. Los árboles madre son individuos pertenecientes a la población natural, seleccionados por su vigorosidad, cuyos frutos fueron colectados en campo y germinados en invernadero. El muestreo fue realizado por funcionarios de la Escuela de Ingeniería Forestal del ITCR. Se colectaron hojas jóvenes de árboles establecidos en vivero. En el caso de la población de Los Almendros, se muestreó la progenie de seis árboles madre. La colecta se realizó en bolsa individual y se asignó un código numérico para definir el grado de parentesco por familias. Dicha nomenclatura refiere a que árboles considerados de una misma familia, comparten al menos uno de sus progenitores, en éste caso se refiere al árbol madre (*Ver Anexo I*). Para Crucitas, se trabajó con una muestra compuesta de 20 individuos, donde la información de las familias no se encontraba disponible.

4.2 Extracción de ADN a partir de tejido foliar de *D. panamensis*

El ADN total fue extraído empleando la metodología basada en CTAB (Doyle y Doyle, 1987) con algunas modificaciones realizadas por Villalobos (2000).

El tejido foliar (aproximadamente 3 folíolos jóvenes) se maceró rápidamente en 5 ml de Buffer de Extracción (Tris-HCl 100 mM pH 8,0 NaCl 1,5 M, EDTA 20 mM, CTAB 2% PVP 2% y Mercaptoetanol 0,2%). Cada muestra se trasvasó a tubos de teflón de 30 ml de capacidad y se incubaron a 55°C por 40 minutos. Una vez finalizado el periodo de incubación se dejaron enfriar los tubos a temperatura ambiente y se adicionó 5 ml de cloroformo-octanol (24:1) mezclando por inversión ~20 veces.

Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 9000 rpm durante 25 minutos, a 4°C en una centrífuga Sorval Superspeed RC2-B. Se trasvasó aproximadamente 3 ml del sobrenadante a un tubo falcon® de 15 ml.

Al sobrenadante se le añadieron 0,1 volúmenes de NaCl 5M y 2/3 de volumen de isopropanol frío. Cada tubo se agitó por inversión y se incubó a 4°C durante 2 horas. Luego se efectuó una centrifugación a 2900 rpm por 15 minutos en un equipo IEC Centra MP4 de International Equipment Company. Se descartó el sobrenadante, tratando de evitar el desprendimiento del botón. Seguidamente, se realizó un lavado con 200 µL de etanol al 70% incubando las muestras a 37°C por 3 minutos. Una vez descartado el etanol, los precipitados se secaron a temperatura ambiente durante 5 minutos con los tubos invertidos y luego se agregaron ~200 µl de agua desionizada estéril y se incubó a 37°C por 10 minutos para facilitar la resuspensión.

Las muestras se trasvasaron a un tubo Eppendorf® de 1,5 ml y se precipitaron agregando 0,1 volumen de acetato de sodio y 2,5 volúmenes de etanol absoluto. Los ácidos nucleicos totales (ANt) se almacenaron precipitados a -20°C hasta su evaluación.

Al momento de su uso, las muestras se centrifugaron a máxima velocidad durante 10 minutos en una centrífuga Eppendorf 5415D, se descartó el sobrenadante, se agregaron 200 µl de etanol al 70% y se incubaron por 5 minutos a 37°C. Posteriormente se descartó el etanol y se secaron los botones a 37°C durante 3 minutos. Finalmente el ADN se resuspendió en ~200 µl de agua desionizada estéril y se incubó 10 minutos a 37°C. La extracción de los ácidos nucleicos totales (ANt) fue verificada a través de electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en buffer TBE 1X (Tris base 90 mM pH 8.0, ácido bórico 90 mM y EDTA 2mM) durante 30 minutos a 90 V constantes. Se usó una fuente de poder BIO-RAD 3000X y una cámara de electroforesis BIO-RAD mini sub cell 175. Se colocaron 3 µl de muestra y 3 µl de buffer carga 6X, sin marcador molecular. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio en una concentración de 0,5 µl/10ml durante 15 minutos. El exceso de solución se eliminó mediante un lavado rápido en agua y las bandas se visualizaron en un transiluminador de luz UV Fotodyne Foto/Phoresis

Basados en los resultados de extracción de ácidos nucleicos totales, se determinó si era necesario el tratamiento con RNasa A. Para dicho tratamiento se tomó una alícuota de 100µl de ANt, se agregaron 2 µl de RNasa a 10µg/ml y se incubaron las muestras a 37°C durante 30 minutos. Pasado este tiempo, nuevamente se agregaron otros 2 µl de RNasa 10µg/ml y se mantuvo la incubación a 37°C por otros 30 minutos. La ribonucleasa se eliminó mediante una extracción con fenol, agregando 0,5 volumen de fenol saturado con TBE y 0,5 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), los tubos se mezclaron por inversión y se centrifugó a 8000 rpm durante 5 minutos. Finalmente se rescató la fase acuosa y se precipitó con 0,1 volumen de acetato de sodio y 2,5 volúmenes de etanol absoluto. El ADN extraído a partir del tejido vegetal fue evaluado siguiendo el protocolo descrito anteriormente para ácidos nucleicos totales. Todas las muestras se almacenaron precipitadas a -20°C y para su utilización en etapas posteriores fue necesario resuspender cada una de ellas siguiendo la metodología usada para ANt.

4.3 Optimización del protocolo de amplificación de fragmentos de longitud polimórfica (AFLP)

El estudio se basó en la técnica AFLP desarrollada por Vos *et al.* (1995), siguiendo las modificaciones descritas por Prentis *et al.* (2004).

4.3.1 Preparación del ADN

4.3.1.1 Digestión y ligación del ADN genómico

Según los resultados obtenidos en la extracción fue necesario optimizar la cantidad de ADN genómico a digerir. Esto se determinó con base en las concentraciones observadas para cada muestra en la evaluación mediante electroforesis (Ver figura 4).

Para la optimización del protocolo inicialmente se utilizó un lote de 15 muestras: 1-1, 1-3, 1-5, 2-1, 2-3, 2-5, 3-1, 3-4, 3-5, 5-3, 5-4, 5-5, 7-2, 7-4 y 7-5, donde el primer número indica el árbol madre. Las diluciones de ADN se trabajaron con una concentración de 30-50 ng/µl y en un volumen final de 10 µl (*Ver anexo 2*).

La digestión se llevo a cabo usando las enzimas *EcoRI* y *MseI* cuyos sitios de restricción se presentan en la figura 3. En ésta reacción se emplearon los 10 µl de ADN

genómico diluido, buffer NEB2 a 1X, 0,2 µl de BSA (10 mg/ml), 2 U de *MseI* y 10 U de *EcoRI* en un volumen final de 20 µl. Las muestras se incubaron a 37°C durante 3 horas en bloque térmico VWR Scientific. Una vez concluida la incubación las enzimas se desactivaron por calentamiento a 65°C durante 20 minutos, finalmente las muestras se enfriaron en hielo previo a la ligación.

En la reacción de ligación se empleó adaptadores de doble banda que reconocen los extremos cohesivos generados en la digestión. Su estructura se muestra en la Figura 3 y la secuencia en el cuadro 1. Para la ligación se utilizaron los 20 µl de ADN digerido, buffer T4 ligasa 1X, adaptador *EcoRI* a 10µM, adaptador *MseI* a 50 µM y 5 U de T4 ADN ligasa (Fermentas) en un volumen final de 40 µl. Las muestras se incubaron a 15°C durante 2 horas y luego a 4°C durante toda la noche. Posteriormente, los productos ligados se almacenaron a -20°C.

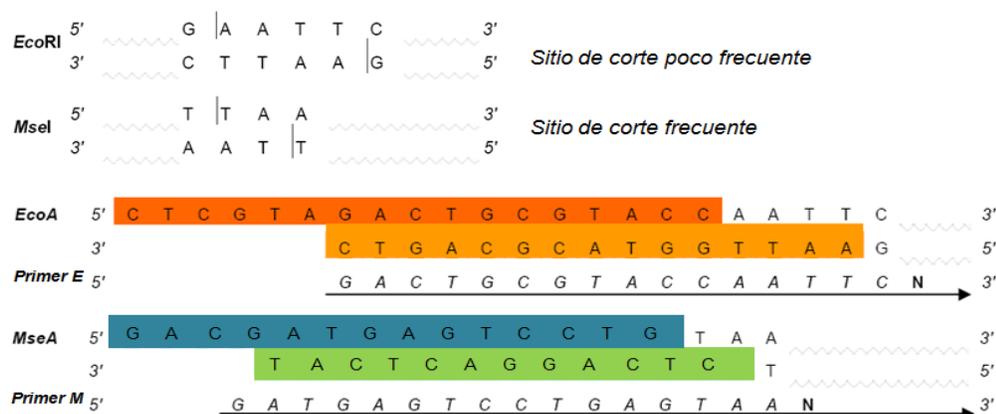


Fig 3. Sitios de corte de las enzimas de restricción utilizadas, estructura de los adaptadores, imprimador-M e imprimador-E. Fuente: Albertini (2006).

Cuadro 1. Secuencia de adaptadores e imprimadores empleados en la preparación del ADN para el análisis AFLP en *D. panamensis*

OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA
Adaptador <i>EcoRI</i> 1	5' CTC GTA GAC TGC GTA CC 3'
Adaptador <i>EcoRI</i> 2	5' AAT TGG TAC GCA GTC 3'
Adaptador <i>MseI</i> 1	5' GAC GAT GAG TCC TGA G 3'
Adaptador <i>MseI</i> 2	5' TAC TCA GGA CTC AT 3'
Imprimador <i>EcoRI</i>	5' GAC TGC GTA CCA ATT C N 3'
Imprimador <i>MseI</i>	5' GAT GAG TCC TGA GTA A N 3'

N: nucleótido (s) que otorga carácter selectivo

4.3.1.2 Amplificación Pre-Selectiva

A partir del ADN ligado con los adaptadores, se realizó una amplificación pre-selectiva. Los imprimadores usados presentan una secuencia base (cuadro 1) que reconocen los fragmentos adaptados y ligados y para efectos de ésta etapa poseen un único nucleótido diferencial (figura 3).

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10 µl. Se utilizó 2 µl de ADN ligado, buffer PCR 1X, 750 µM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, imprimadores M-C y E-A cada uno a 750 nM y 0,25 U de *Taq* Polimerasa (Fermentas) en un termociclador 2720 PE de Applied Bio Systems. El perfil térmico usado se describe a continuación (cuadro 2).

Cuadro 2. Perfil térmico amplificación Pre-Selectiva de AFLP

ETAPA	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	CICLOS
Desnaturalización inicial	94	2 minutos	1
Desnaturalización	94	30 segundos	
Hibridación	56	30 segundos	25
Extensión	72	2 minutos	
Extensión Final	60	10 minutos	1
Almacenamiento	4	∞	-

La pre-amplificación selectiva se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, se colocaron 3 µl de producto de PCR y 3 µl de buffer carga 6X. Las condiciones de corrida fueron 90V durante 45 minutos. Una vez verificado el “smear” o barrido de ADN característico de la correcta pre-amplificación (Figura 5), se preparó el ADN muestra para la amplificación selectiva mediante una dilución del total de cada producto de PCR en 135 µl de Buffer TE 1X. Las pre-amplificaciones diluidas se almacenaron a -20°C hasta su uso.

4.3.2 Amplificación selectiva: Tamizaje de imprimadores

En la fase de tamizaje de imprimadores se trabajó con 10 muestras de ADN de almendro originario de Aguas Zarcas de San Carlos, provenientes de 5 familias de árboles propios de la zona, a saber: 1-3, 1-5, 2-3, 2-5, 3-4, 3-5, 5-3, 5-5, 7-2 y 7-5. En ésta etapa se

evaluaron 26 combinaciones de imprimadores, y se determinó cuáles de ellas podrían utilizarse para la validación del protocolo (Cuadro 3).

La reacción de amplificación selectiva se realizó a partir de 2 µl de ADN pre-amplificado y diluido, buffer PCR 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, imprimadores *MseI*-NNN y *EcoRI*-NNN (cuadro 4) cada uno a 750 nM y 0,2 U de *Taq* Polimerasa (Fermentas) en un volumen final de reacción de 10 µl.

Cuadro 3. Imprimadores selectivos evaluados para el análisis AFLP en *D. panamensis*

IDEM	COMBINACIÓN **
1	E-AC / M-CAG
2	E-AC / M-CCG
3	E-AC / M-CTA
4	E-AC / M-CTG
5	E-AC / M-CTAG
6	E-AC / M-CTGC
7	E-AAA / M-CTG
8	E-AAC / M-CAG
9	E-AAC / M-CCG
10	E-AAC / M-CTG
11	E-AAC / M-CCCA
12	E-AAC / M-CTAG
13	E-AAG / M-CTG
14	E-AAT / M-CTG
15	E-ACA / M-CCA
16	E-ACA / M-CTC
17	E-ACA / M-CTG
18	E-ACC / M-CTG
19	E-ACG / M-CTG
20	E-ACT / M-CTG
21	E-AGC / M-CAG
22	E-AGC / M-CCG
23	E-AGC / M-CTA
24	E-AGC / M-CTG
25	E-AGG / M-CTG
26	E-ATC / M-CTG

** Las secuencias base de los imprimadores *MseI* y *EcoRI* se presentan en el cuadro 1

El perfil térmico de la amplificación selectiva se resume a continuación (cuadro 4):

Cuadro 4. Perfil térmico para la amplificación selectiva de AFLP en *D. panamensis*

ETAPA	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	CICLOS
Desnaturalización inicial	94	5 minutos	1
Desnaturalización	94	30 segundos	
Hibridación (<i>Touchdown</i>)	65-57*	30 segundos	8
Extensión	72	2 minutos	
Desnaturalización	94	30 segundos	
Hibridación	56	30 segundos	20
Extensión	72	2 minutos	
Extensión Final	60	30 minutos	1
Almacenamiento	4	∞	-

* Se reduce la temperatura 1°C por cada ciclo

Las muestras se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% y 7M de Urea, utilizando una cámara vertical Life Technologies modelo S2 y buffer TBE 0,5X

El gel se sometió a una precorrida con buffer carga 6X a una potencia de 40W por 20 minutos con el fin de orientar en una misma dirección las moléculas de la matriz. Las muestras se prepararon agregando 3 µl de buffer carga 6X a la totalidad del producto PCR y se colocaron 4 µl de la mezcla en cada pozo. Se utilizó 3 µl de marcador GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas). Las condiciones de corrida fueron potencia constante de 40W durante 1,5 horas, con voltaje inicial de 1125V y final de 1450V.

Las bandas se visualizaron mediante tinción con nitrato de plata. Inmediatamente finalizada la corrida electroforética, el gel se mantuvo en agitación constante e inmerso en ácido acético al 7,5% durante 20 minutos, utilizando un agitador 3508 de Lab. Line Instruments Inc. Luego se realizaron dos lavados por 2 minutos en agua desionizada. A continuación se incubó en solución de tinción de nitrato de plata al 0,1% y formaldehído (i.a. 35%) al 0,2% por 20 minutos. Posteriormente se eliminó el exceso de plata mediante un lavado con agua desionizada durante 30 segundos y se reveló con una solución fría de

carbonato de sodio monohidratado al 3%, formaldehído al 0,25% y tiosulfato de sodio al 0,01%. La tinci3n se detuvo con 3cido ac3tico al 7,5% por 10 minutos y se realiz3 un 3ltimo lavado con agua desionizada por 5 minutos. El gel fijado y teñido se dej3 secar a temperatura ambiente. Finalmente, las im3genes fueron escaneadas con un esc3ner Epson Perfection 1250.

4.4 Implementaci3n del protocolo AFLP

De acuerdo a los resultados obtenidos en la fase de tamizaje, fueron seleccionadas seis combinaciones de imprimadores, cuyos perfiles de amplificaci3n mostraron en conjunto 242 *loci* para el an3lisis de cada individuo. Se trabaj3 con la totalidad de las muestras (n=60), utilizando los productos preamplificados con anterioridad, y realizando la digesti3n, ligaci3n y pre-amplificaci3n de las muestras restantes no incluidas en la etapa de optimizaci3n del protocolo.

La preparaci3n del ADN muestra sigui3 la metodolog3a descrita en el apartado anterior, manteniendo las condiciones de reacci3n, periodos de incubaci3n y perfil t3rmico de pre-amplificaci3n (cuadro 2). Para la digesti3n del ADN, nuevamente fue necesario ajustar su concentraci3n final (aproximadamente 30-50 ng/ μ l) a trav3s de diluciones (Ver *Anexo 2*).

Finalmente, la amplificaci3n selectiva se realiz3 de acuerdo al protocolo optimizado, con la salvedad de que se utilizaron 3 μ l de ADN pre-amplificado y diluido, en lugar de los 2 μ l originales. Se siguieron las condiciones de PCR y perfil t3rmico ya mencionados (Cuadro 4) y se trabaj3 con las combinaciones seleccionadas (cuadro 5). Las amplificaciones se evaluaron por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida.

Cuadro 5. Combinaciones de imprimadores seleccionadas para an3lisis AFLP en *D. panamensis* provenientes de la Zona Norte de Costa Rica

IDEM	COMBINACI3N
1	E-AC / M-CTG
2	E-AAT / M-CTG
3	E-ACA / M-CTG
4	E-ACC / M-CTG
5	E-AGC / M-CTG
6	E-ATC / M-CTG

4.5 Análisis de datos

Se realizó una matriz de presencia/ausencia de bandas para describir las variaciones genéticas observadas en cada uno de los individuos. En total se analizaron 242 *loci* dominantes generados a través del protocolo AFLP.

Los análisis se realizaron agrupando las muestras en dos niveles jerárquicos: 1). por familias de individuos emparentados, compuestas por medios hermanos seleccionados a partir de la progenie de cada madre (información disponible sólo para Los Almendros) y 2). por población: individuos provenientes de Crucitas y Los Almendros.

Las frecuencias alélicas, el número de bandas únicas por familia, el índice de diversidad de Nei (1973), el índice de Shannon, la distancia genética de Nei (1978) y el análisis de varianza molecular (AMOVA) fueron determinados con el programa GenAlEx V 6.1 (Peakall y Smouse, 2006). Además, se empleó el programa Splittree V 4.10 (Huson y Bryant, 2006) para realizar el análisis de agrupamiento por individuo y por familia, basado en la matriz de datos crudos y la distancias genéticas calculadas. Dicho programa permitió generar dendrogramas NJ (del inglés “Neighbour Joining”) basados en el método del vecino más cercano (Saitou y Nei, 1987). También se realizó un agrupamiento UPGMA (del inglés “Unweighted Pair-Group Method Average”). Finalmente, utilizando el programa SYSTAT 11 se realizó un análisis de coordenadas principales (PCA).

5. RESULTADOS

5.1 Extracción de ADN a partir de tejido foliar de *D. panamensis*

La calidad del ADN extraído a través del protocolo basado en CTAB fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa. Dicha evaluación permitió verificar que las muestras cumplieran con los estándares para su utilización en la metodología AFLP.

Para todas los individuos se obtuvo una banda definida de ADN genómico de alto peso molecular, las diferencias en intensidad de la fluorescencia revelan que la concentración es variable entre muestras.

Algunas de las extracciones presentan indicios de ADN degradado, ya que demuestran un barrido característico. No obstante, se determinó que todo el ADN posee una calidad aceptable para su uso en etapas posteriores.

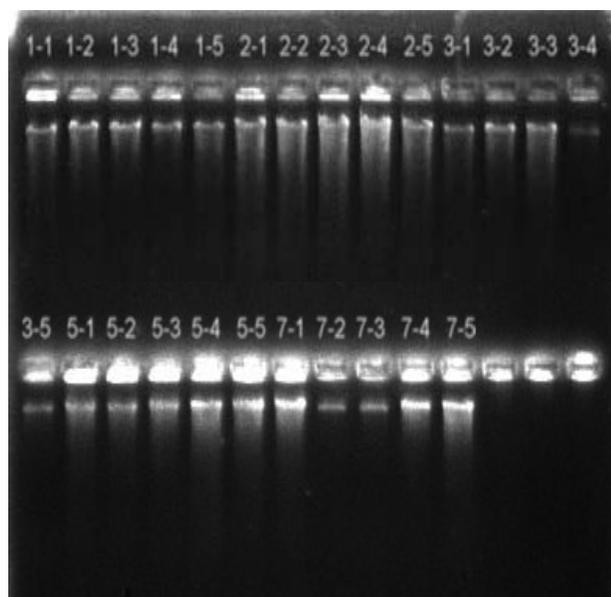


Fig 4. Evaluación de la extracción de ADN en gel de agarosa 0,8%. Muestras obtenidas del tejido foliar de *D. panamensis* de la Zona Norte de Costa Rica.

5.2 Optimización del protocolo de amplificación de fragmentos de longitud polimórfica (AFLP)

5.2.1 Preparación del ADN

Una vez evaluado el ADN genómico se determinó la proporción de las diluciones necesarias para la digestión. Según el protocolo original de Vos *et al.* (1995), la metodología AFLP requiere entre 300 y 500 ng de ADN muestra. Por tanto la concentración de ADN genómico de *D. panamensis* se ajustó por medio de diluciones a un aproximado de 30-50 ng/ μ l.

La valoración inicial del ADN tratado se realizó previa a la amplificación selectiva y permitió evaluar la efectividad del protocolo en las etapas de digestión, ligación y pre-amplificación. Para todas las muestras logró observarse el “smear” o barrido característico esperado, el cual se presenta como una fluorescencia de bajo peso molecular (<1500 pb) a lo largo de la parte inferior del carril, tenue, y poco diferencial para la totalidad de las muestras evaluadas (Figura 5).

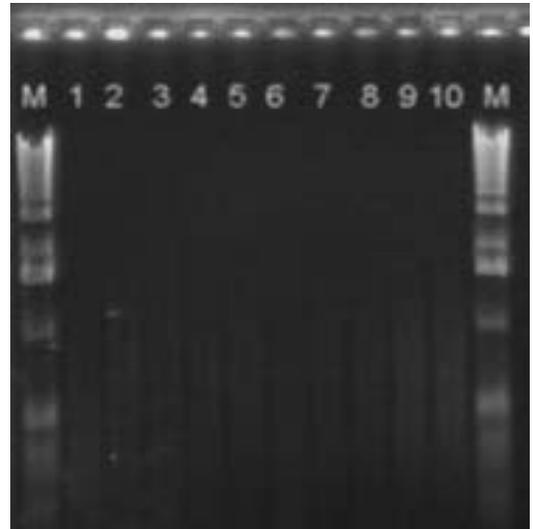


Fig 5. Evaluación de la amplificación pre-selectiva en gel de agarosa al 0,8%. Muestras de *D. panamensis* de la Zona Norte de Costa Rica. Árboles: 1-2, 1-4, 2-2, 2-4, 3-2, 3-3, 5-1, 5-2, 7-1 y 7-3.

5.2.2 Amplificación selectiva: Tamizaje de imprimadores

Las 26 combinaciones de imprimadores probadas (cuadro3) se examinaron en búsqueda de patrones de bandas definidos, polimórficos y abundantes, que permitieran generar un perfil de amplificación característico de muestra. Cada una de las combinaciones ensayadas fue calificada y valorada de acuerdo a los resultados obtenidos para los perfiles respectivos (cuadro 6). Los criterios considerados para la evaluación de los imprimadores más sobresalientes fueron: calidad (intensidad y claridad) de las bandas y cantidad de polimorfismos entre individuos.

Cuadro 6. Resultados del tamizaje de imprimadores para AFLP en *D. panamensis* provenientes de la Zona Norte de Costa Rica

	M-CAG	M-CCA	M-CCG	M-CTA	M-CTC	M-CTG	M-CCCA	M-CTAG	M-CTGC
E-AC	+/-	*	+/-	-	*	++	*	-	-
E-AAA	*	*	*	*	*	-	*	*	*
E-AAC	-	*	-	*	*	+/-	+/-	-	*
E-AAG	*	*	*	*	*	+/-	*	*	*
E-AAT	*	*	*	*	*	+	*	*	*
E-ACA	*	-	*	*	-	++	*	*	*
E-ACC	*	*	*	*	*	+	*	*	*
E-ACG	*	*	*	*	*	+/-	*	*	*
E-ACT	*	*	*	*	*	+/-	*	*	*
E-AGG	*	*	*	*	*	+/-	*	*	*
E-AGC	-	*	-	-	*	++	*	*	*
E-ATC	*	*	*	*	*	+	*	*	*

Evaluación del perfil de amplificación:

- ++ : Muy bueno
- + : Bueno
- +/- : Regular
- : Malo
- * : *no evaluado*

La valoración de los imprimadores permitió seleccionar 6 combinaciones con perfiles prometedores para el análisis AFLP. Todas las mezclas elegidas incluyen el imprimador M-CTG, ya que dicha secuencia demostró patrones superiores respecto a lo observado en las pruebas con los demás cebadores M. En vista de los buenos resultados obtenidos bajo el uso de este oligonucleótido, el tamizaje fue direccionado hacia juegos de imprimadores que diferían en uno o varios de los nucleótidos selectivos del cebador E. Los perfiles de las combinaciones seleccionadas se presentan en la figura 6.

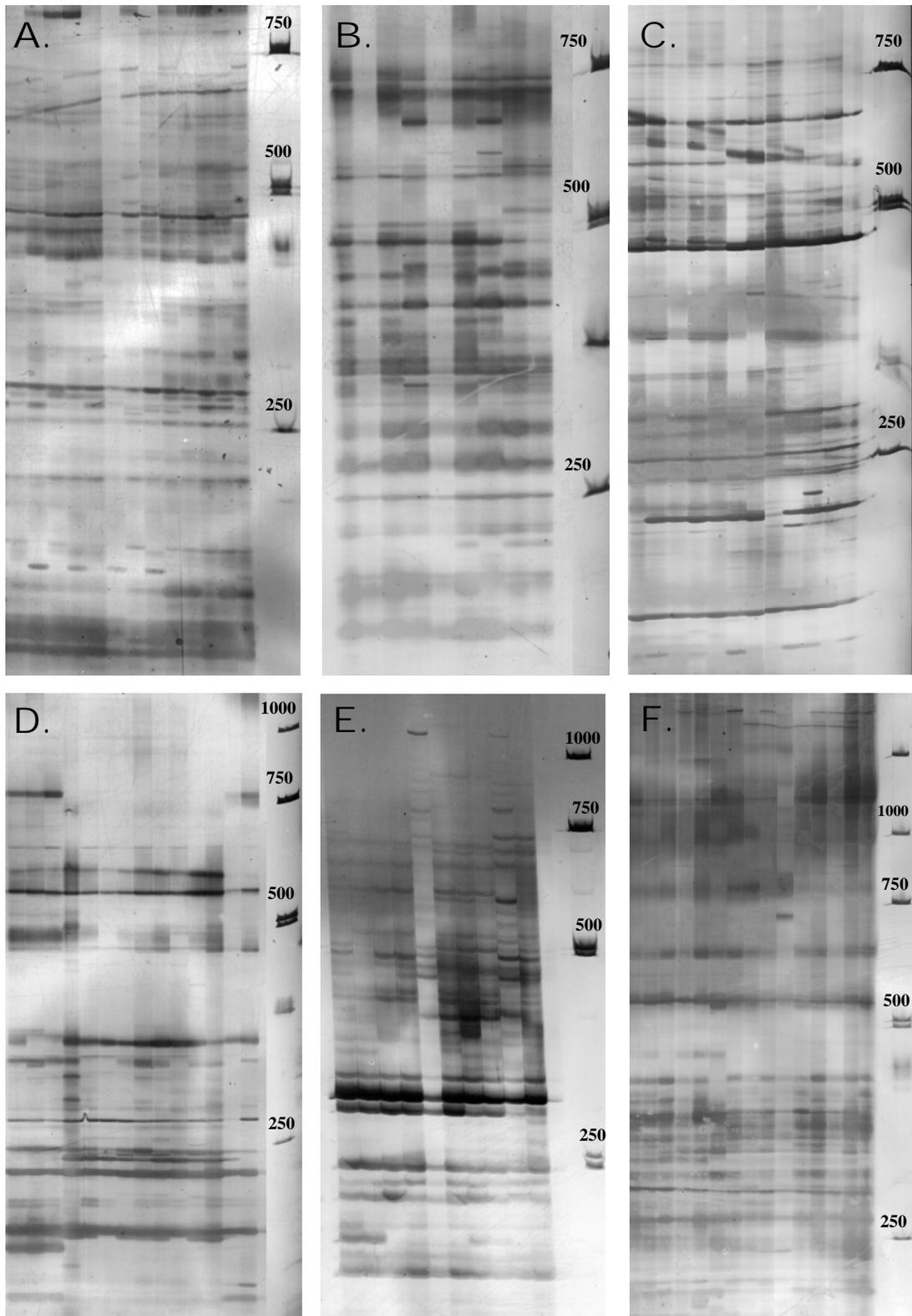


Fig 6. Combinaciones de imprimadores seleccionados para el análisis AFLP en geles PAGE 6%/7M urea en *Dipteryx panamensis*. **A.** E-AC/M-CTG **B.** E-AAT/M-CTG **C.** E-ACA/M-CTG **D.** E-ACC/M-CTG **E.** E-AGC/M-CTG **F.** E-ATC/M-CTG

5.3 Implementación del protocolo AFLP

La amplificación selectiva con las seis combinaciones de imprimadores proporcionó un total de 242 bandas (cuadro 7) que corresponde a los *loci* dominantes usados para el análisis de la huella de cada individuo y las relaciones entre individuos, familias (información disponible únicamente para la población de Los Almendros) y poblaciones de árboles que componen el estudio.

Cuadro 7. Cantidad de bandas obtenidas por cada combinación seleccionada para AFLP en *D. panamensis* proveniente de la Zona Norte de Costa Rica

IDEM	COMBINACIÓN	No. BANDAS
1	E-AC / M-CTG	38
2	E-AAT / M-CTG	37
3	E-ACA / M-CTG	35
4	E-ACC / M-CTG	40
5	E-AGC / M-CTG	47
6	E-ATC / M-CTG	45
TOTAL		242
Promedio		40,33

La información generada en éste paso se usó para confeccionar la matriz de ausencia/presencia de bandas, reportada en código binario y utilizada como datos de entrada en los programas estadísticos consultados para el análisis.

5.4 Análisis de datos

5.4.1 Diversidad genética

Se obtuvo el cálculo de las frecuencias alélicas de los 242 loci para cada una de las familias que lograron identificarse, así como la frecuencia promedio para el total de las muestras en estudio. Dichos datos se emplearon como base para análisis estadísticos posteriores.

En el cuadro 8 se presentan los valores para la estimación de la diversidad genética de las seis familias de individuos de *D. panamensis* colectados a partir de la población natural de Los Almendros.

Cuadro 8. Parámetros de diversidad genética para seis familias seleccionados de *D. panamensis* provenientes de la población Los Almendros, San Carlos de Costa Rica

GRUPO	n	PLP %	PB	H	I
Familia 1	8	43,39	6	0,150	0,227
Familia 2	9	31,82	2	0,104	0,160
Familia 3	5	26,45	0	0,106	0,155
Familia 5	5	30,58	0	0,116	0,173
Familia 6	4	30,99	3	0,126	0,184
Familia 7	9	34,71	1	0,119	0,180
Promedio		32,99		0,120	0,180
	σ	2,35		0,005	0,007

n= tamaño de la muestra; *PLP*= porcentaje de loci polimórficos; *PB*= bandas únicas; *H*= índice de diversidad según Nei (1973), *I*= índice de diversidad de Shannon

En el análisis de los individuos agrupados por familia (medios hermanos maternos), se observó un valor promedio de 0,120 para la diversidad genética según Nei (1973), siendo la Familia 1 la más diversa, con mayor cantidad de bandas propias y loci polimórficos.

En el cuadro 9 se presenta los mismos parámetros genéticos valorados anteriormente, pero con los resultados de la evaluación por poblaciones. Para éste caso, es de esperar que los índices de diversidad genética sean superiores, en vista que no se evalúan sub-grupos emparentados, sino poblaciones.

Cuadro 9. Parámetros de diversidad genética para grupos descendientes de dos poblaciones naturales de *D. panamensis* de la Zona Norte de Costa Rica

GRUPO	N	PLP %	PB	H	I
Los Almendros	40	83,06	42	0,241	0,371
Crucitas	20	62,81	10	0,195	0,299
Promedio		72,93		0,218	0,335
	σ	10,12		0,008	0,012

n= tamaño de la muestra; *PLP*= porcentaje de loci polimórficos; *PB*= bandas únicas; *H*= índice de diversidad según Nei (1973), *I*= índice de Shannon

5.4.2 Distancia genética

A nivel de poblaciones, se obtuvo un valor de acuerdo a Nei (1978) de 0,078 para la distancia genética entre Los Almendros y Crucitas. Este dato indica un alto grado de similitud genética al comparar ambos grupos. En el cuadro 10 se muestra la matriz de distancia genética entre las familias pertenecientes a Los Almendros.

Cuadro 10. Matriz de distancia genética según Nei (1978) para seis familias provenientes de Los Almendros, San Carlos Costa Rica

	FAM 1	FAM 2	FAM 3	FAM 5	FAM 6	FAM 7
FAM 1	0,000					
FAM 2	0,202	0,000				
FAM 3	0,242	0,190	0,000			
FAM 5	0,240	0,187	0,106	0,000		
FAM 6	0,243	0,202	0,157	0,096	0,000	
FAM 7	0,224	0,179	0,209	0,137	0,116	0,000

5.4.3 Análisis de varianza molecular (AMOVA)

Con el fin de determinar la proporción y distribución de la variación genética entre poblaciones y grupos de familias, se empleó el AMOVA. Los resultados resumidos en el cuadro 11 revelan que la mayor parte de dicha variación se encuentra a nivel de individuos. No obstante, entre familias también existe una buena proporción de la variabilidad (31%), mientras que entre las dos poblaciones las diferencias no parecen ser significativas.

Cuadro 11. Análisis de varianza molecular (AMOVA) para progenies de dos poblaciones de *D. panamensis* de la Zona Norte de Costa Rica, basado en marcadores AFLP

Origen de la variación	df	SS	MS	Est. Var.	V %
Entre poblaciones	1	238,417	238,417	0,016	0%
Entre familias	5	581,306	116,261	13,193	31%
Dentro de las familias	53	1588,894	29,979	29,979	69%

df= grados de libertad; *SS*= suma de la desviación al cuadrado; *MS*= media de la desviación; *Est. Var*=estadístico de varianza; *V%*= porcentaje de la varianza total.

5.4.4 Análisis de agrupamiento

Para expresar los resultados de las relaciones genéticas entre los individuos y los grupos (parentesco), se realizaron distintos métodos de ordenación. En la figura 7 se presenta el agrupamiento NJ (del inglés “Neighbour Joining” o vecino más cercano) por individuos y con análisis de remuestreo, basado en la distancia genética según Nei (1978). Como se puede observar, la disposición de las muestras concuerda con el grado de parentesco; donde los medios hermanos se encuentran agrupados debido a su cercanía genética.

Cabe resaltar que las familias 5 y 6, además de la 3, se presentan como un mismo grupo, mientras que la familia 1 posee las mayores disimilitudes al compararse con miembros de la misma población.

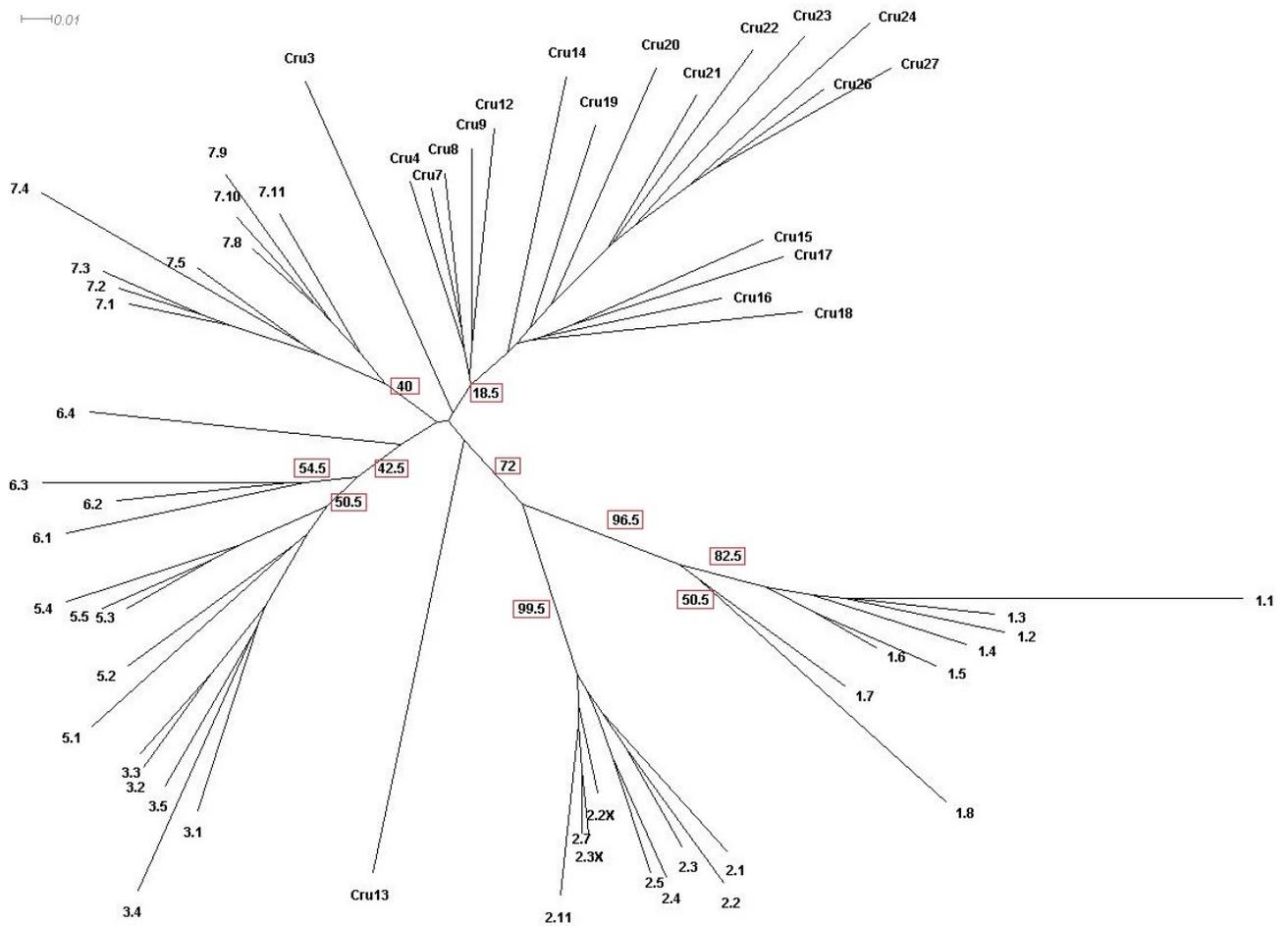


Fig 7. Dendrograma NJ generado mediante marcadores AFLP en *D. panamensis* proveniente de la Zona Norte de Costa Rica. Los datos resaltados en rojo representan los valores de agrupamiento con remuestreo.

Además, los miembros de la población de Crucitas se encuentran ordenados en tres subgrupos principales, mientras que la muestra Cru13 presenta grandes diferencias genéticas respecto a individuos supuestamente emparentados.

A nivel de familias (información disponible sólo para descendientes de la población de Los Almendros), también se realizó un dendrograma UPGMA basado en las distancias genéticas de Nei (1978) presentadas en el cuadro 10. Como se muestra en el esquema de la figura 8, nuevamente las familias 5 y 6 aparecen como miembros de un mismo grupo, con mayor cercanía genética entre sí.

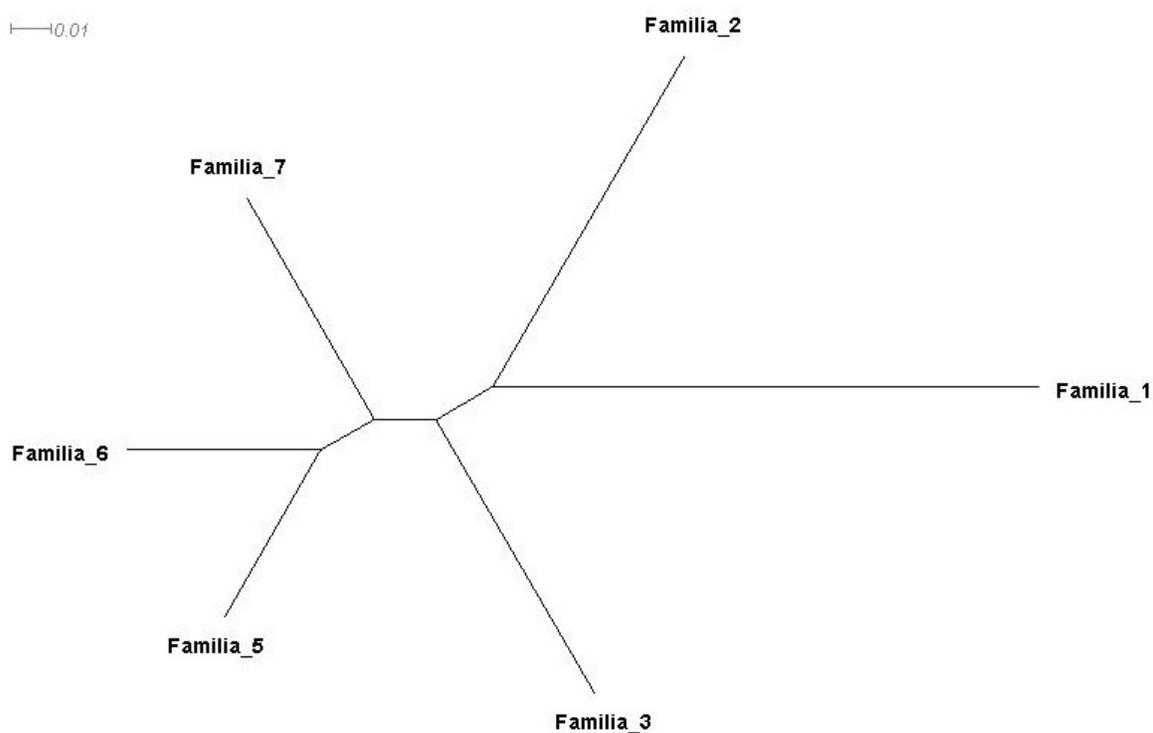


Fig 8. Dendrograma UPGMA basado en distancia genética de Nei (1978) para las seis familias de *D. panamensis* de la población Los Almendros. Aguas Zarcas de San Carlos, Costa Rica.

Para corroborar los resultados de agrupamiento, se generaron dendrogramas UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Average) por individuos y NJ por familias, donde las progenies de las madres 5, 6 y 3 se mantuvieron como un conjunto (*Ver anexo 3*).

El análisis de coordenadas principales (PCoA), muestra que la mayor proporción de individuos analizados puede agruparse en tres conjuntos. Tanto los miembros de Crucitas como los de Familia 1 conforman grupos independientes y diferenciados, el tercer conjunto es bastante heterogéneo y se compone de individuos de las otras familias provenientes de la población de Los Almendros (Figura 9). Cabe resaltar que algunas muestras como 1.1, 1.8, 3.4, 7.4 y Cru13, se encuentran fuera de los grupos señalados, lo cual concuerda con lo observado en el dendrograma NJ de la figura 7.

Además, en la figura 9 se aprecia que al descomponer los datos de distancia genética en múltiples variables, es posible diferenciar los miembros de las dos poblaciones evaluadas, ya que sitúan en cuadrantes distintos: Los Almendros en el extremo positivo de PCoA2 y Crucitas en el extremo negativo.

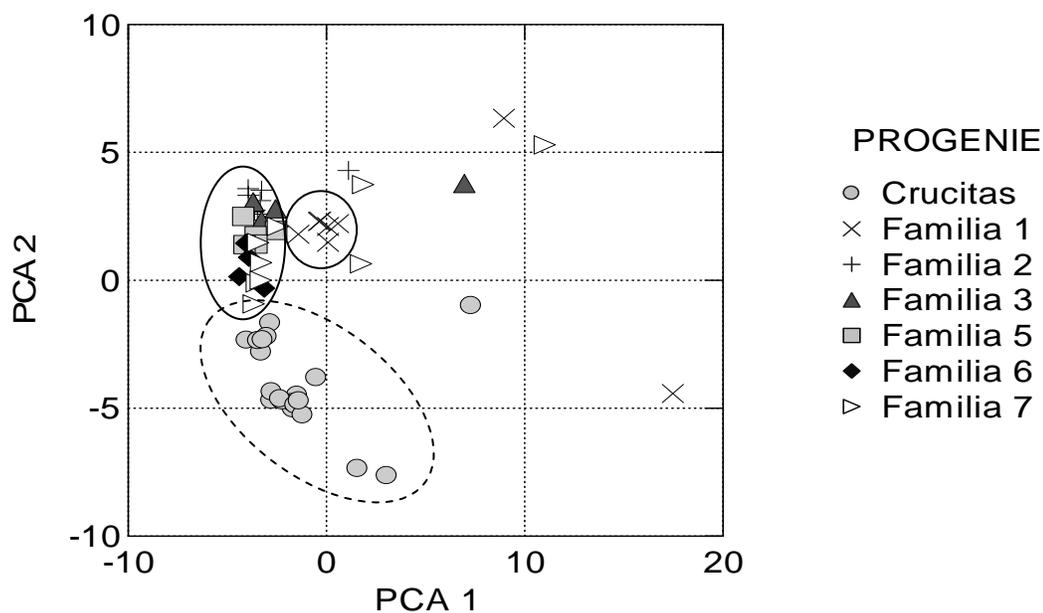


Fig 9. Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) para progenies seleccionadas de *D.panamensis* provenientes de San Carlos, Costa Rica. Datos generados a partir de la distancia genética de Nei (1978) entre individuos.

6. DISCUSIÓN

El protocolo de extracción basado en CTAB (Doyle y Doyle, 1987), demostró ser efectivo para la obtención de ADN de calidad. El bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB) es un detergente catiónico que a bajas concentraciones de sal tiene la propiedad de precipitar diferencialmente los ácidos nucleicos, manteniendo en solución compuestos neutros como proteínas y polisacáridos. De ésta manera, bajo las condiciones de extracción empleadas el CTAB forma micelas cargadas positivamente que crean complejos con el ADN y ARN, facilitando así su recuperación (Del Sal *et al.* 1989).

Probablemente, las diferencias observadas en las concentraciones de ADN se deban a condiciones propias de cada muestra al momento de realizar la extracción. La ligera degradación observada para algunos casos, no parece interferir en la obtención de resultados positivos en las etapas posteriores. Sin embargo, la calidad del ADN y la eficiencia global del protocolo, podría mejorarse empleando nitrógeno líquido en el proceso de maceración.

Respecto a la optimización del protocolo AFLP, se determinó que la metodología seguida es idónea para la preparación de las muestras, ya que permite obtener buenos patrones de amplificación. Al valorar la etapa de preparación del ADN, se logró verificar la existencia de un barrido de 100-1500 pb, el cual corresponde a la gran cantidad de fragmentos pre-amplificados generados en la digestión y ligados con los adaptadores. La amplificación pre-selectiva tiene por objetivo reducir la cantidad de fragmentos de ADN que serán utilizados como molde en el siguiente ciclo de amplificación (Vos *et al.* 1995). Su evaluación mediante electroforesis busca garantizar la efectividad de los pasos iniciales del protocolo y a este nivel no debe apreciarse diferencias entre las muestras.

Por otro lado, la etapa de tamizaje fue direccionada hacia la elección de imprimadores E, siendo el imprimador M-CTG una constante. En miembros de la subfamilia Papilionoideae, donde se ha aplicado el análisis AFLP para diversidad genética, se ha reportado el uso de éste cebador (Bermingham *et al.* 2005 y Gao *et al.* 2007). Sin embargo, resulta curioso que a pesar de que se probaron un total de nueve variantes de imprimador M, sólo una de ellas mostró los resultados esperados. Es probable que dicha secuencia se relacione con aspectos propios de las

muestras seleccionadas, la especie o el género. Sin embargo, para corroborar dicha idea es necesario realizar otros estudios que impliquen un muestreo más representativo de otras poblaciones de *D. panamensis* dentro y fuera de Costa Rica, así como especies emparentadas con el almendro amarillo, tal como *Dipteryx odorata*.

De acuerdo a Acuña *et al.* (2005), la técnica AFLP permite amplificar entre 40 y 100 fragmentos de ADN de distintos tamaños por ensayo. Para árboles neotropicales a los cuales se ha aplicado éste marcador, se ha observado un rango más bajo. Así por ejemplo, en *Pterocarpus officinalis* (Fabaceae) se ha reportado un promedio de 68 fragmentos por combinación (Aide *et al.* 2002), mientras que para *Gmelina arborea*, Araya *et al.*(2005^b) obtuvieron 53 bandas en promedio. En *Tectona grandis* se observaron 47 fragmentos por ensayo (Araya *et al.* 2005^a). Para *Swietenia macrohylla*, *Cedrela odorata*, y *Lonchocarpus costarricensis* se reportan medias de 43, 29 y 27 bandas, respectivamente (Kremer *et al.* 2005). En el caso de *D. panamensis* se observó un promedio de 40 bandas por combinación, lo cual se encuentra dentro del rango mencionado.

Sin embargo, la cantidad de fragmentos generados en esta investigación pudo haber sido mayor, ya que se presentaron algunos inconvenientes durante la electroforesis. Probablemente, condiciones de corrida con resistencia diferencial a lo largo del gel, provocaron patrones de bandas poco consistentes que no pudieron ser evaluados.

El análisis de la diversidad genética a nivel de familias, presentó un porcentaje de *loci* polimórficos (PLP) de alrededor del 33% dentro de cada grupo (cuadro 8). Al tratarse de árboles emparentados, donde miembros de una misma familia comparten hasta un 50% de sus genes, es de esperarse un porcentaje de polimorfismo no muy alto. Los datos analizados por población, para las regiones de Los Almendros y Crucitas, muestran que el PLP% para cada uno fue de 83% y 62% respectivamente. Hanson *et al.* (2008^a) reportan que *D. panamensis* es una especie poliploide (tetraploide), lo que garantiza un mayor número de copias alélicas por individuo. Debido a esto, aumentan las probabilidades de encontrar heterocigotos y obtener un índice de *loci* polimórficos elevado. En árboles neotropicales, miembros de Papilionoideae, como *Pterocarpus officinalis*, también se han obtenido valores que rondan el 70% para análisis AFLP (Aide *et al.* 2002).

El índice de diversidad genética de Nei (1973) calculado para las dos poblaciones mostró valores de 0,241 para Los Almendros y 0,195 en Crucitas, lo cual se encuentra dentro del ámbito observado para estudios de la misma índole realizados en especies del Neotrópico. En *Cedrela odorata* se reportan niveles de diversidad intrapoblacional de 0,13-0,21 (Cornelius *et al.* 2008), mientras que en *Swietenia macrophylla* se observaron valores de 0,17-0,38 (Heller, 2003). En *P. officinalis*, Aide *et al.* (2002) obtuvieron un rango de 0,15-0,27 al analizar nueve poblaciones naturales.

De acuerdo a Hanson *et al.* (2008^b), los índices de diversidad genética de poblaciones naturales de *D. panamensis* analizadas con microsatélites, no registraron diferencias significativas entre sí. En este estudio analizaron ocho poblaciones ubicadas en cuatro hábitats distintos en el cantón de Sarapiquí, Costa Rica. Los resultados obtenidos con AFLP, señalan a los descendientes de la población de Los Almendros como el grupo más diverso. No obstante, los datos calculados para análisis genéticos de la población de Crucitas, pueden no ser del todo representativos, ya que se trabajó con un tamaño de muestra reducido ($n= 20$). Esto implica un sesgo importante al aplicar métodos estadísticos. De igual manera, el muestreo únicamente de individuos sobresalientes debido a sus características fenotípicas, implica otro aspecto sesgado que necesita consideración.

La diversidad genética intrafamiliar muestra valores muy similares entre los grupos y consecuentemente inferiores al dato poblacional, ya que se trata de individuos emparentados. En este punto, determinar los grados de variabilidad genética de las familias, es de suma importancia, debido a que en programas de mejoramiento genético es necesario identificar los posibles grupos candidatos que presenten una alta diversidad y puedan formar parte de un eventual huerto semillero (Acuña *et al.* 2002). Los niveles de variabilidad, son los que otorgan a la población en conjunto la habilidad de adaptarse a cambios ambientales, así como permitir la sobrevivencia ante ataques de plagas y enfermedades (Marcucci *et al.* 2005). Uno de los fines que busca este proyecto, es precisamente colaborar en la conservación y mejoramiento de *D. panamensis* a través de la estandarización del protocolo AFLP.

Bajo ésta perspectiva, la familia 1 se perfila como un conjunto de interés, ya que presenta los mayores índices de diversidad, polimorfismos y bandas únicas. Por lo tanto, se puede afirmar que se trata del grupo más variable dentro de los descendientes de Los Almendros.

Las bandas únicas observadas por familia y entre los grupos poblacionales, tienen un alto potencial si se considera su aplicación en estrategias de mejoramiento genético. Estos fragmentos de ADN podrían convertirse en marcadores diagnósticos para la selección de individuos y el seguimiento de cruces controlados. De ésta manera, los datos recopilados para Crucitas y Los Almendros, así como para cada una de las familias, tienen una utilidad potencial en programas asistidos por macardores moleculares.

La distancia genética es otro de los criterios de consideración al trabajar en procesos de selección y mejora del material. El empleo de semillas provenientes de individuos con alto grado de parentesco, puede causar la pérdida de las ganancias genéticas esperadas. Estas circunstancias obligan a imponer restricciones de distancias mínimas entre genotipos emparentados, con el fin de disminuir la depresión por endogamia (Zelener *et al.* 2005). En el cuadro 10, en el apartado de resultados, nuevamente la familia 1 se presenta como el conjunto con mayores diferencias genéticas respecto a los demás. En la misma medida, se encuentran las distancias entre los pares de familias 2 y 6, 3 y 7. Por otro lado, las familias 5 y 6, presentan el mayor índice de similitud observado (0,909 según Nei - 1978), lo cual indica que podrían manejarse como un mismo grupo de selección.

Al evaluar la progenie seleccionada de las poblaciones de Crucitas y Los Almendros, se obtuvo un alto índice de similitud en su estructura genética (distancia genética de Nei = 0,078). Además, el análisis AMOVA (*Ver resultados* cuadro 11) establece que la variabilidad no se distribuye entre estos dos grupos, sino que mayoritariamente lo hace entre individuos (69%) dentro de cada población con un fuerte componente aportado por las familias (31%). Esto implica que, en función del establecimiento de un programa de mejoramiento, sería recomendable manejar las familias o incluso los individuos como unidades de selección.

Los análisis de agrupamiento permiten esquematizar lo observado a partir de las distancias genéticas. En primer lugar, los datos de agrupamiento por individuos demuestran

que la técnica aplicada ofrece relaciones genéticas fiables, ya que reconoce y agrupa como elementos genéticamente más cercanos, a quienes efectivamente están emparentados. Es decir, logra reconstruir la estructura de las familias. Lo anterior nos permite inferir que la metodología aplicada es válida para análisis de parámetros genéticos en *D. panamensis* y puede ser aplicada con toda seguridad a posteriores estudios de diversidad, conservación y selección de material.

No obstante, la falta de datos respecto al grado de parentesco entre los individuos descendientes de la población de Crucitas, impiden corroborar si los agrupamientos donde se observan tres conjuntos principales, obedecen un patrón de consanguinidad.

El dendrograma de la figura 7, permite también identificar individuos que presentan las mayores distancias genéticas en comparación a miembros de su mismo grupo. Así por ejemplo, parte de los datos de diversidad observados dentro de la familia 1, pueden explicarse al considerar la poca similitud existente entre el grueso de las muestras y los individuos 1.1 y 1.8. Además, las muestras 3.4, 7.4, Cru3 y Cru13, poseen también diferencias importantes con sus respectivas agrupaciones. El análisis de coordenadas principales (PCA) verifica estos resultados y revela que los dos primeros componentes calculados explican el 31% y el 20% de la variación genética (Figura 9). El PCA es además, el único método de agrupamiento que facilita la diferenciación clara entre las regiones de Crucitas y Los Almendros y donde se presenta a las familias 2, 3, 5, 6 y 7 como parte de un mismo conjunto.

En el dendrograma UPGMA por familias (figura 8), las progenies de las familias 5 y 6 se ubican como parte de una misma rama, lo cual denota un emparentamiento en mayor escala. Sin embargo, se desconoce la ubicación exacta de los individuos madre que dan origen a las familias utilizadas en el estudio. La única información disponible establece que los árboles madre se encuentran separados por unos 200 metros de distancia, pero no se conoce su distribución espacial exacta ni la estructura genética de la población original. Esto impide corroborar si los datos genéticos se correlacionan con las referencias geográficas.

El almendro amarillo se caracteriza por su copiosa producción de frutos, los cuales forman parte de la dieta de muchas especies de mamíferos, quienes sirven a su vez como medio de dispersión de la semilla. El murciélago frutero *Artibeus lituratus* es uno de sus

mayores dispersores a largas distancias (Hanson, 2006). En las poblaciones naturales de especies forestales, el flujo del material genético se mantiene gracias a la influencia que ejercen los dispersores de semillas y polen, quienes establecen la estructura genética en cada ambiente.

Se ha reportado que los patrones de propagación de las semillas de *D. panamensis* pueden alcanzar distancias de más de 800 m en zonas boscosas fragmentadas (Hanson *et al.* 2007). Esto refuerza la probabilidad de que los individuos madre muestreados en Los Almendros pertenezca a una misma familia. Pero, al no disponer de muestras de tejido foliar de las madres, no puede corroborarse el grado de parentesco.

Otro factor a considerar para comprender los resultados de agrupamiento, es el origen del polen. Las flores de *D. panamensis* son hemafroditas, de floración asincrónica (Perry y Starret, 1980) y autoestériles (Flores, 1999). Esto significa que poseen polinización cruzada, donde intervienen más de 90 especies de abejas (Thiele, 2002). Según Hanson *et al.* (2008^b), la dispersión del polen depende del hábitat de cada población y alcanza distancias de hasta 2,4km. Incluso en su estudio, Hanson concluye que para el 12% de los miembros de las poblaciones de Sarapiquí, no pueden identificarse los posibles padres.

Lo anterior permite explicar, hasta cierto punto, el origen de la variación dentro de cada familia. Los medios hermanos comparten hasta la mitad de su material genético, por tanto, el ADN del padre sería la principal fuente de variación dentro de cada grupo. Siendo así, es posible que los individuos con mayores distancias genéticas del resto (como es el caso de las muestras 1.1 y 1.8 para la familia 1), procedan de fuentes de polen exógenas, es decir de árboles que no forman parte de la población o que no fueron muestreado debido a su lejanía geográfica.

En términos generales, la aplicación de la metodología AFLP permitió estimar los parámetros genéticos básicos para los descendientes de las poblaciones de Crucitas y Los Almendros, así como realizar el análisis de su diversidad genética. La estandarización del protocolo es de gran utilidad para su posterior aplicación en estudio de poblaciones naturales y grupos seleccionados para programas de mejoramiento.

7. CONCLUSIONES

- El protocolo de extracción basado en CTAB permite la recuperación de ADN de alta calidad.
- La metodología de preparación del ADN es óptima para el análisis de marcadores AFLP.
- Se obtuvieron seis combinaciones de imprimadores para AFLP en *Dipteryx panamensis*.
- El imprimador M-CTG mostró ser el único cebador M que permite obtener perfiles óptimos de amplificación en *D. panamensis*.
- Las bandas únicas encontradas por familia pueden emplearse como marcadores moleculares para el seguimiento de cruces controlados.
- La varianza molecular mostró distribuirse en mayor proporción a nivel de individuos.
- Basado en los parámetros calculados, la familia 1 se presenta como un conjunto de interés debido a su alta diversidad genética.
- En vista que las familias 5 y 6 presentan una alta similitud genética, podrían considerarse un mismo grupo de selección.
- El protocolo AFLP estandarizado para *D. panamensis* puede emplearse como metodología de apoyo en programas de conservación y mejoramiento de material.

8. RECOMENDACIONES

- Para efectos de futuros estudios, se recomienda recopilar los datos de la ubicación geográfica exacta de los árboles madre y realizar análisis estadísticos que correlacionen los parámetros genéticos con la distancia física.
- No es recomendable trabajar con muestras compuestas de progenie, como el caso de la población de Crucitas, donde no se conoce con exactitud quienes integran la población ni la estructura de las familias de individuos.
- Con el fin de agilizar las extracciones y ahorrar reactivos, se recomienda utilizar el protocolo de mini extracciones de ADN basado en CTAB y probado en especies forestales.
- Las extracciones de ADN podrían mejorar su rendimiento utilizando nitrógeno líquido en la etapa de maceración.
- Se aconseja, además, cuantificar el ADN una vez extraído, con el fin de estandarizar las concentraciones necesarias para la digestión.
- Es recomendable mejorar las condiciones de corrida durante la electroforesis en geles de poliacrilamida, con el fin de evitar patrones de bandas poco consistentes. En este punto, incluso sería recomendable, analizar la posibilidad de amplificar las muestras con un equipo de PCR en tiempo real y eliminar así la etapa de evaluación mediante electroforesis.
- Finalmente, se recomienda realizar análisis genéticos con otros marcadores moleculares como microsátélites para corroborar los datos de diversidad.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACUÑA C.; HARRAND L.; MARCÓ M.; MARCUCCI S. y TORALES S. 2002. Utilización de marcadores moleculares en el análisis de la variabilidad genética de una población de mejoramiento de *Eucalyptus grandis*. En: XVII Jornadas Forestales de Entre Ríos. Octubre, 2002. Concordia, Entre Ríos, AR. 4 p.
- ACUÑA C. 2005. La biotecnología forestal (en línea). Consejo argentino para la información y desarrollo de la biotecnología. Consultado: 14 de setiembre 2009. Disponible en: <http://www.argenbio.org/adc/uploads/imagenes_doc/planta_stransgenicas/biotecnologiaforestal.pdf>
- ACUÑA C.; LÓPEZ G.; MARCUCCI S.; PATHAUER P.; TORALES S. y ZELENER N. 2005. *Eucalyptus globulus*: Uso de AFLP para determinar los posibles orígenes de razas locales. IDIA XXI. No. 8: 143-146.
- AIDE T.; McMILLAN W. y RIVERA E. 2002. Patterns of genetic diversity and biogeographical history of the tropical wetland tree, *Pterocarpus officinalis* (Jacq.), in the Caribbean basin. Molecular Ecology. No. 11: 675-683.
- ALBERTINI E. 2006. AFLP protocol (en línea). Consultado: 29 de junio 2009. Disponible en: <<http://www.emidioalbertini.com/pdf/AFLPprotocol.pdf>>
- ARAYA E.; MURILLO O. y ROCHA O. 2003. Mejoramiento Genético Forestal asistido por marcadores genéticos. En: IV Congreso Forestal Nacional, Setiembre, 2003. San José, CR. sp.
- ARAYA E.; AGUILAR G.; KEIM P.; MURILLO O.; ROCHA O. y WOOLBRIGHT S. 2005^a. Possibilities of breeding teak (*Tectona grandis* L.f.) in Costa Rica assisted by AFLP markers. Kurú: Revista Forestal. 2 (5): 8-16.
- ARAYA E.; AGUILAR G.; MURILLO O. y ROCHA O. 2005^b. Relaciones genéticas en una colección de clones de *Gmelina arborea* (Roxb) reveladas con marcadores AFLP. Kurú: Revista Forestal. 2(6): 14-28.

- ARNÁEZ E. y MOREIRA I. 2001. Algunos aspectos del desarrollo radicular de almendro (*Dipteryx panamensis* (Pitt.) Record & Mell) y botamarra (*Vochysia ferruginea*) relacionados con la expresión fenológica en plantación y zonas de de protección. Informe Final de Proyecto de Investigación. Vicerrectoría de Investigación y Extensión. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, CR. 44 p.
- AZOFEIFA A. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas: Aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana*. 17(2): 221-242.
- BERMINGHAM S.; DICK C.; HARDESTY B.; HUBBELL S. y KREMER A. 2005. Spatial genetic structure of *Simarouba amara* Aubl. (Simaroubaceae), a dioecious, animal-dispersed Neotropical tree, on Barro Colorado Island, Panama. *Heredity*. No. 95: 290-297.
- BONACCORSO F.; GLANZ W. y SANFORD C. 1980. Feeding assemblages of mammals at fruiting *Dipteryx panamensis* (Papilionaceae) trees in Panama: seed predation, dispersal and parasitism. *Biología Tropical*. No. 28: 61–72.
- CARRERA A.; HELGUERA M.; PICCA A. y SALOMÓN N. 2004. Marcadores Moleculares. En: *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. Ediciones INTA. Buenos Aires, AR. 448p.
- CHAVES E. 2001. Candidato a Monumento Natural: El Almendro de Montaña. *Ambientico*. No. 23: 27-32.
- CHAVERRI I. 1996. Elaboración de los mapas preliminares de población de *Dipteryx panamensis* (Pittier) en La Cureña, Región Huétar Norte, Costa Rica. Tesis Lic. Ing. Forestal. Escuela de Ingeniería Forestal. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, CR. 52 p.
- CITES. 2009. CITES species database (en línea). Consultado: 6 de octubre 2009. Disponible en: < <http://www.cites.org/eng/resources/species.html>>

- CONDIT R. y PEREZ R. 2008. Tree Atlas of Panama: *Dipteryx panamensis* Benth. Center for Tropical Forest Science, Panamá. (en línea). Consultado: 12 de setiembre 2009. Disponible en: < <http://ctfs.si.edu/webatlas/findinfo.php?specid=2409&leng=english> >
- CORNELIUS J.; DE LA TORRE A.; LÓPEZ C. e YGLESIAS E. 2008. Genetic (AFLP) diversity of nine *Cedrela odorata* populations in Madre de Dios, southern Peruvian Amazon. *Forest Ecology and Management*. 255 (2): 334-339.
- DEL SAL G.; MANFIOLETTI G. y SCHNEIDER C. 1989. The CTAB-DNA precipitation method: a common mini-scale preparation of template DNA from phagemids, phages or plasmids suitable for sequencing. *Biotechniques*. 7 (5): 514-520.
- DOYLE J. y DOYLE J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical*. No. 19: 11-15.
- FLORES E. 1999. La planta: estructura y función. Volumen 2. Editorial Tecnológica de Costa Rica, CR. 884 p.
- FONDO NACIONAL DE FINANCIAMIENTO FORESTAL (FONAFIFO). 2003. Proyecto “Reactivación de la Reforestación Comercial en Costa Rica (REFORESTA)”. (en línea). Consultado: 28 de agosto 2009. Disponible en: <http://www.fonafifo.com/text_files/proyectos/pr_reforesta.pdf>
- FOURNIER L. 2003. *Dipteryx panamensis* (Pittier) Record & Mell. En: Tropical Seed Tree Manual. (en línea). Consultado: 22 de julio 2009. Disponible en: <<http://www.rngr.net/Publications/ttsm/Folder.2003-07-11.4726/PDF.2004-01-12.2247/file.>>
- GAO H.; HAN J.; WANG Z. y WU Y. 2007. Genetic diversity and population structure of *Caragana korshinskii* revealed by AFLP. *Crop Science*. 47: 1737 – 1743.
- GRATTAPAGLIA D. 2000. Molecular Breeding of *Eucalyptus*: Stage or the Art, Operational Applications and Technical Challenges. En: *Molecular Markers and Genome Mapping*

- in Woody Plants. Jain, S.M & Minocha S.C (editores). Kluwer Academics Publisher. Dordrecht, NL. 451– 474.
- HAINES R. 1994. La biotecnología en el mejoramiento de especies arbóreas forestales: tendencias y prioridades de la investigación. *Unasyuva*. No. 45: 46-52.
- HANSON T. 2006. Effects of habitat fragmentation on the reproductive ecology and conservation genetics of the almendro (*Dipteryx panamensis*), a keystone rainforest tree. Tesis Ph.D. Mejor in Natural Resource. College of Graduate Studies, University of Idaho. Idaho, US. 113 p.
- HANSON T.; BRUNSFELD S.; FINEGAN B. y WAITS L. 2007. Conventional and genetic measures of seed dispersal for *Dipteryx panamensis* (Fabaceae) in continuous and fragmented Costa Rican rain forest. *Journal of Tropical Ecology*. No. 23: 635-642.
- HANSON T.; BRUNSFELD S.; FINEGAN B. y WAITS L. 2008^a. Characterization of microsatellite markers for the almendro (*Dipteryx panamensis*), a tetraploid rainforest tree. *Molecular Ecology Resources*. No. 8: 425-427.
- HANSON T.; BRUNSFELD S.; FINEGAN B. y WAITS L. 2008^b. Pollen dispersal and genetic structure of the tropical tree *Dipteryx panamensis* in a fragmented Costa Rican landscape. *Molecular Ecology Resources*. No. 17: 2060–2073.
- HELLER T. 2003. Population genetic structure in two neotropical tree species, *Swietenia macrophylla* King. and *Tetragastris panamensis* (Engl.) Kuntze.: The influence of life history traits. Tesis M.Sc. Royal Botanic Garden Edinburgh. University of Edinburgh. UK. 83 p.
- HUSON D. y BRYANT D. 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution*. No. 23: 254-26.
- KREMER A.; CARON H.; CAVERS S.; COLPAERT N.; GHEYSEN G.; GRIBELS R.; LEMES M.; LOWE A.; MARGIS R.; NAVARRO C. y SALGUEIRO F. 2005.

- Monitoring genetic diversity in tropical trees with multilocus dominant markers. *Heredity*. No. 95: 274-280
- MARCUCCI S.; ACUÑA C.; TORALES S.; ZELENER N.; PATHAVER P.; LÓPEZ G.; HARRAND L. y HOPP E. 2005. En huertos semilleros de especies de *Eucalyptus*: Evaluación de la variabilidad genética. *IDIA XXI*. No. 8: 180-184.
- MONTAGNINI F. 2004. Plantaciones forestales con especies nativas: una alternativa para la producción de madera y la provisión de servicios ambientales. *Recursos Naturales y Ambiente*. No. 43: 28-35.
- MUELLER U. y WOLFENBARGER L. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in Ecology and Evolution*. 14 (10): 389-394.
- MURILLO O.; ROJAS F.; BADILLA Y.; ALBERTAZZI F.; VILLALOBOS H. y BRENES H. 2008. Mejoramiento y conservación genética de especies forestales amenazadas y de importancia económica asistido con marcadores genéticos. Proyecto de investigación conjunto del ITCR, UCR y UNA. En preparación.
- NEI M. 1973. The theory and estimation of genetic distance. En: *Genetic structure of populations*. Morton N.E, University Press, Hawaii, Honolulu. USA. 45-54.
- NEI M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. No. 89: 583-590.
- PEAKALL R. y SMOUSE P. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. No. 6: 288-295.
- PERRY D. y STARRETT A. 1980. The pollination ecology and blooming strategy of a Neotropical emergent tree, *Dipteryx panamensis*. *Biotropica*. No. 12: 307-313.
- PIOTTO D. 2001. Plantaciones forestales en Costa Rica y Nicaragua: comportamiento de las especies y preferencias de los productores. Tesis M.S.c. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, CR. 130 p.

- PRENTIS P.; VESEY A.; MEYERS N. y MATHER P. 2004. Genetic structuring of the stream lily *Helmholtzia glaberrima* (Philydraceae) within Toolona Creek, south-eastern Queensland. Australian Journal of Botany. No. 52: 201–207.
- RODRÍGUEZ L. 2009. *Dipteryx panamensis* (en línea). Consultado: 21 de julio 2009. Disponible en: <<http://www.fincaleola.com/Almendro%20Espanol.htm>>
- ROJAS F. 2005. Evaluación de microsatélites para el análisis de las relaciones genéticas en clones de *Vochysia guatemalensis*. Tesis B.Sc. Ing. en Biotecnología. Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, CR. 59 p.
- SAITOU N. y NEI M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution. No. 14: 406-425.
- THIELE R. 2002. Abejas polinizadoras de árboles del Nordeste de Costa Rica; ecología, protección e importancia silvicultural de las Centridini. Trad: David Díaz. GTZ. Eschborn, DE. 57p
- VALADEZ E. y KAHL G. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas: teoría y protocolos de laboratorio. Mundi-Prensa, S.A de C.V. México D.F, MX. 147 p.
- VILLALOBOS H. 2000. Análisis genético molecular de tres valiosas especies nativas maderables de Costa Rica. Tesis M.Sc. Escuela de Química. Universidad de Costa Rica. San José, CR. 109 p.
- VOS P.; HOGERS R.; BLEEKER M.; REIJANS M.; VAN DE LEE T.; HORNES M.; FRIJTERS A.; POT J.; PELEMAN J.; KUIPER M. y ZABEAU M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research. 23 (21): 4407 – 4417.
- ZELENER N.; MARCUCCI S.; RODRÍGUEZ J.; GELID P.; PATHAUER P.; HOPP E.; LÓPEZ C. y BARTOLONI N. 2005. *Eucalyptus dunnii*: Selección de huertos semilleros mediante la aplicación de marcadores moleculares. IDIA XXI. No. 8: 215-221.

10. ANEXOS

Anexo 1. Código de numeración para identificación de muestras: Se trabajó con un total de 6 familias de árboles provenientes de Los Almendros y un grupo mixto de la población de Crucitas. En la numeración otorgada por muestra, el primer dígito indica la familia. Crucitas se identifica únicamente con las siglas CRU

Cuadro 12. Código de numeración para el manejo de muestras por familia

GRUPO	MUESTRA	GRUPO	MUESTRA	
Familia 1	1-1	Familia 7	7-1	
	1-2		7-2	
	1-3		7-3	
	1-4		7-4	
	1-5		7-5	
	1-6		7-8	
	1-7		7-9	
	1-8		7-10	
Familia 2	2-1		7-11	
	2-2		Población Crucitas	Cru3
	2-3			Cru4
	2-4	Cru7		
	2-5	Cru8		
	2-2X	Cru9		
	2-3X	Cru12		
	2-7	Cru13		
2-11	Cru14			
Familia 3	3-1	Cru15		
	3-2	Cru16		
	3-3	Cru17		
	3-4	Cru18		
	3-5	Cru19		
Familia 5	5-1	Cru20		
	5-2	Cru21		
	5-3	Cru22		
	5-4	Cru23		
	5-5	Cru24		
Familia 6	6-1	Cru26		
	6-2	Cru27		
	6-3			
	6-4			

Anexo 2. Concentración inicial de ADN de *D.panamensis* para AFLP: previo a la digestión, fue necesario estandarizar las concentraciones de cada muestra basado en los resultados de la extracción, la cantidad de ADN se ajustó a un volumen final de 10 μ l (Cuadro 13). La concentración del ADN a digerir se encuentra aproximadamente entre 30-50 ng/ μ l.

Cuadro 13. Diluciones de ADN de *D. panamensis* realizadas para alcanzar una concentración entre 300-500 ng en cada muestra. Volumen final de 10 μ l.

	MUESTRA	ADN (μ l)	AGUA (μ l)		MUESTRA	ADN (μ l)	AGUA (μ l)
Familia 1	1-1	7	3	Familia 7	7-1	5	5
	1-2	7	3		7-2	10	-
	1-3	7	3		7-3	10	-
	1-4	10	-		7-4	7	3
	1-5	10	-		7-5	7	3
	1-6	7	3		7-8	8	2
	1-7	10	-		7-9	7	3
	1-8	10	-		7-10	7	3
Familia 2	2-1	5	5		7-11	7	3
	2-2	5	5		Cru3	10	-
	2-3	5	5		Cru4	6	4
	2-4	5	5	Cru7	8	2	
	2-5	7	3	Cru8	8	2	
	2-2X	6	4	Cru9	8	2	
	2-3X	6	4	Cru12	10	-	
	2-7	6	4	Cru13	10	-	
Familia 3	2-11	7	3	Cru14	10	-	
	3-1	10	-	Cru15	10	-	
	3-2	7	3	Cru16	10	-	
	3-3	7	3	Cru17	8	2	
	3-4	10	-	Cru18	7	3	
Familia 5	3-5	10	-	Cru19	7	3	
	5-1	7	3	Cru20	8	2	
	5-2	8	2	Cru21	7	3	
	5-3	8	2	Cru22	8	2	
	5-4	6	4	Cru23	5	5	
Familia 6	5-5	6	4	Cru24	6	4	
	6-1	10	-	Cru26	5	5	
	6-2	8	2	Cru27	5	5	
	6-3	10	-				
	6-4	8	2				

Anexo 3. Análisis complementarios de agrupamiento genético

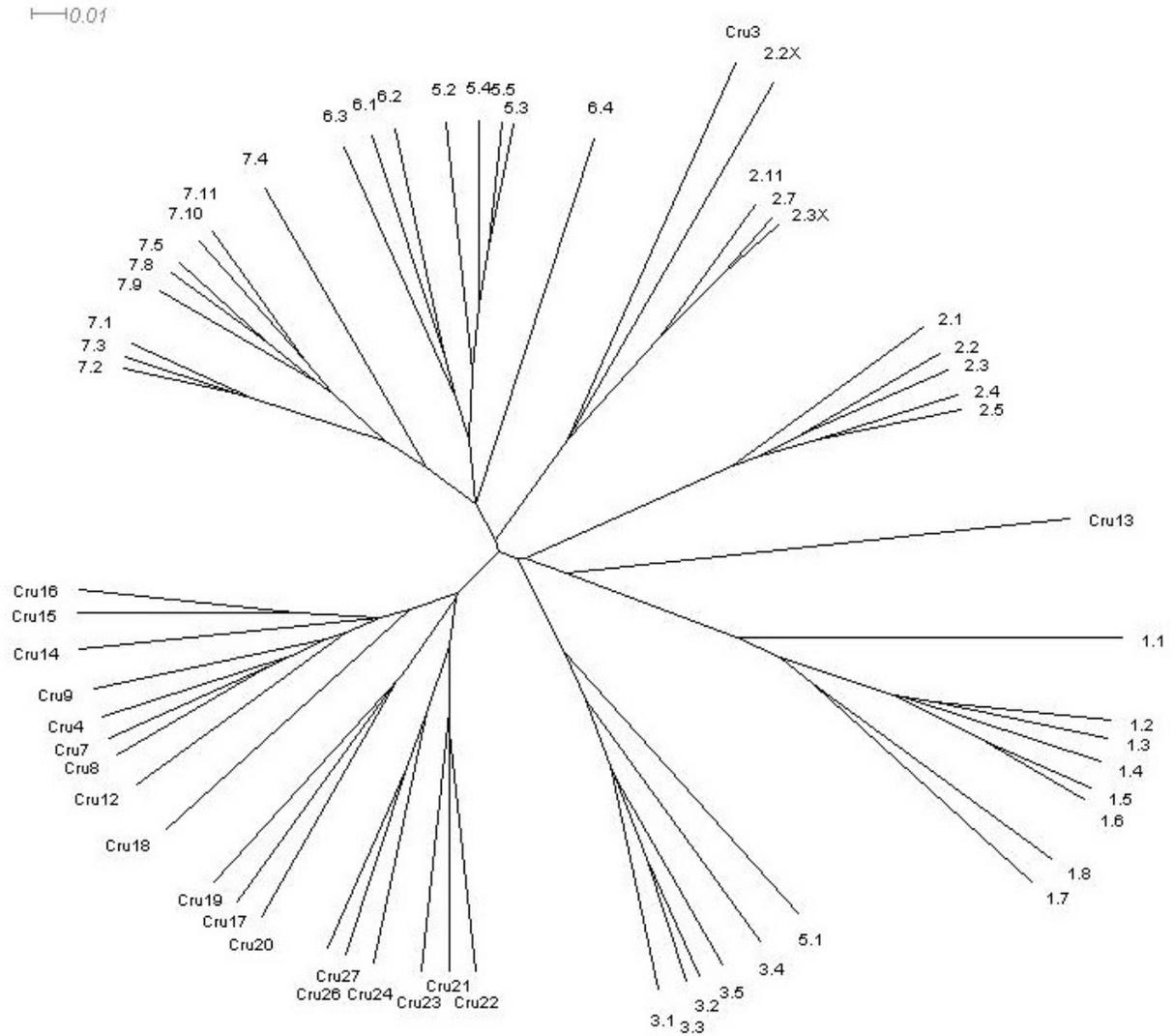


Fig 10. Dendrograma UPGMA para 60 individuos de *D. panamensis* seleccionados de la progenie de poblaciones naturales de la Zona Norte de Costa Rica

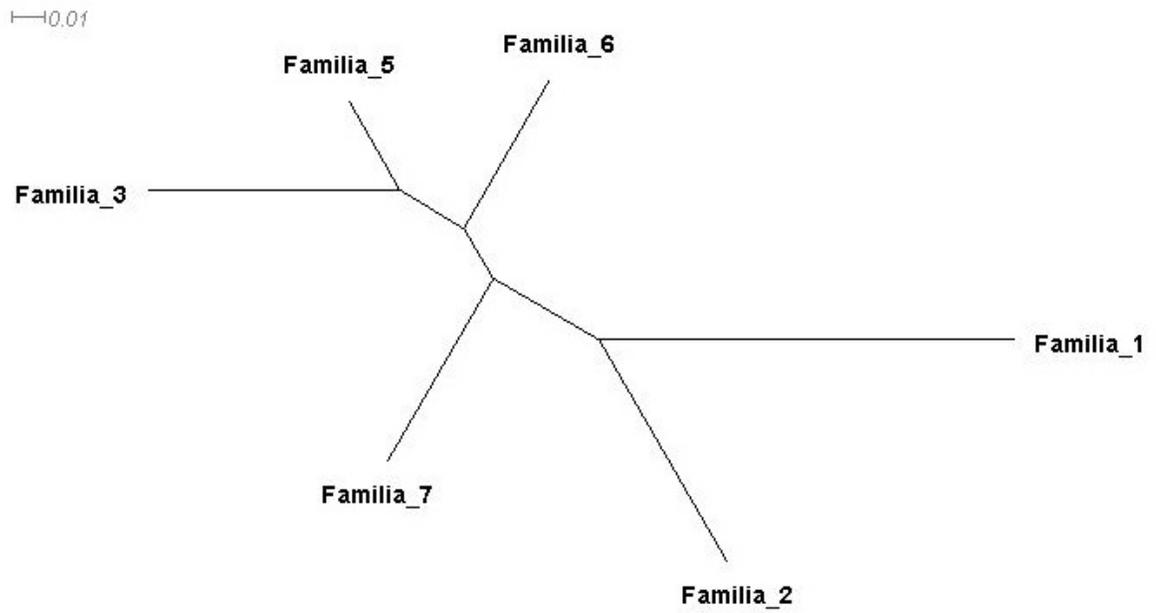


Fig 11. Dendrograma NJ basado en distancia genética de Nei (1978) para las seis familias de *D. panamensis* de la población Los Almendros. San Carlos, Costa Rica.